

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Molekulare Bildgebung und gezielte Radionuklidtherapie extrathyreoidaler
Tumore nach Stammzell-basiertem Natrium/Iodid-Symporter
(NIS) - Gentransfer**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marie-Christine Kolokythas
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin:	Prof. Dr. Christine Spitzweg
Mitberichterstatter:	PD Dr. Sebastian Lehner PD Dr. Andrei Todica
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	06.06.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1 Genthherapie	4
1.2 Stammzellen.....	6
1.2.1 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	6
1.2.2 Charakterisierung von MSC.....	6
1.2.3 Klinische Anwendungen von MSC.....	8
1.2.3.1 MSC und tissue repair.....	8
1.2.3.2 MSC und Autoimmunerkrankungen.....	9
1.2.3.3 MSC und solide Tumore.....	11
1.2.3.4 MSC als Gentranfervehikel.....	12
1.3 Der Natrium - Iodid Symporter.....	14
1.3.1 Molekulare Charakterisierung.....	14
1.3.2 Regulation des Natrium-Iodid Symporters	16
1.3.3 Endogene NIS Expression in der Schilddrüse.....	18
1.3.3.1 Natrium-Iodid Symporter bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen	18
1.3.3.2 Natrium-Iodid Symporter bei Schilddrüsenknoten	18
1.3.3.3 Maligne Schilddrüsenerkrankungen	19
1.3.4 Endogene NIS Expression in der Brustdrüse	19
1.3.5 NIS als Reportergen.....	20
1.3.6 Exogene NIS Expression mittels Gentransfer.....	21
1.3.7 Exogene NIS Expression mittels systemischem Gentransfer.....	24
1.3.7.1 Viren als Gentransfervehikel	24
1.3.7.2 Polyplexe als Gentranfervehikel	24
1.3.8 NIS und seine Bedeutung als theranostisches Gen	27
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	29
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.1.1 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA.....	30
2.1.2 DNA-Minipräparation zur Isolierung von Plasmid DNA	30

2.1.3 DNA-Maxipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.1.4 RNA Isolierung	32
2.1.5 Konzentrationsbestimmung durch Photometrie	32
2.1.6 cDNA Herstellung	33
2.1.7 mRNA Nachweis mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)	33
2.2 Zellkultur und Zelllinien	34
2.2.1 Verwendete Zelllinien	34
2.2.2 Medium und Zellkulturbedingungen	34
2.2.3 Kryokonservierung	35
2.2.4 Proliferationsassay	36
2.2.5 Transfektion	36
2.2.5.1 Geneticin als selektives Antibiotikum	36
2.2.5.2 Transiente Transfektion der immortalisierten murinen MSC	36
2.2.5.3 Transiente Transfektion der immortalisierten humanen MSC	37
2.2.5.4 Stabile Transfektion der immortalisierten murinen MSC	37
2.2.5.5 Stabile Transfektion der immortalisierten humanen MSC	38
2.3 Iod-Uptake Versuche <i>in vitro</i>	38
2.3.1 Iod-Uptake Assay	38
2.3.2 Kinetik der Iodakkumulation	38
2.3.3 Iod-Efflux	39
2.4 Western Blot	39
2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot-Analyse (Membranpräparation)	39
2.4.2 Protein-Konzentration (Bradford-Proteinbestimmung)	40
2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.4.4 Western Blot-Analyse	40
2.5 <i>in vitro</i> Clonogenic Assay	41
2.5.1 Durchführung Monokulturen	41
2.5.2 Färbung und Auswertung	42
2.5.3 Durchführung Kokulturen	42
2.5.4 Färbung und Auswertung	42

2.6 Statistik.....	43
2.7 Verwendete Geräte.....	44
2.8 Verwendete Materialien	45
3. ERGEBNISSE.....	50
3.1 Selektion der erfolgreich mit NIS transfizierten Zellen durch Messung der Iod-Akkumulation	50
3.2 Charakterisierung des NIS-induzierten Iod-Uptakes	52
3.2.1 Iodaufnahme-Kinetik	52
3.2.2 Iod Efflux	53
3.3 Nachweis von NIS mRNA mittels quantitativer PCR.....	55
3.4 NIS Protein Nachweis durch Western Blot Analyse.....	55
3.5 Nachweis der Zelltoxizität von ¹³¹ Iod im <i>in vitro</i> Clonogenic Assay in Monokulturen	57
3.6 Nachweis der Zelltoxizität von ¹³¹ Iod im <i>in vitro</i> Clonogenic Assay in Mischkulturen	59
4. DISKUSSION	62
4.1 Neue Ansätze im systemischen Gentransfer	62
4.1.1 Mesenchymale Stammzellen als Gentransfervehikel.....	62
4.1.2 Potentielle Rolle von MSC in der Tumorentstehung	65
4.2 Effizienzerhöhung der NIS Gentherapie	67
4.2.1 Verwendung alternativer Radionuklide	67
4.2.1.1 ¹⁸⁸ Rhenium.....	67
4.2.1.2 ²¹¹ Astat	69
4.2.2 Radioiodtherapie in Kombination mit Radiosensitizern	70
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6. LITERATURVERZEICHNIS	72
7. ABKÜRZUNGEN	86
8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	93
9. DANKSAGUNG.....	94
10. VERÖFFENTLICHUNGEN	95
11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	97

1. EINLEITUNG

1.1 Gentherapie

Der Begriff Krebs wird für eine heterogene Gruppe von Erkrankungen genutzt, die durch das unkontrollierte Wachstum und Streuen von malignen Zellen charakterisiert wird und jede Art von Gewebe betreffen kann. Diese Neoplasien können das umgebende Gewebe infiltrieren und an entfernte Stellen metastasieren [1]. Krebsleiden sind weltweit bei beiden Geschlechtern die führende Ursache von Mortalität und Morbidität. Im Jahr 2012 wurde die weltweite Anzahl an Neudiagnosen auf 14 Millionen und die der Todesfälle auf 8,2 Millionen geschätzt. Im gleichen Jahr wurden in Europa die Neudiagnosen auf 3,45 Millionen und die Todesfälle auf 1,75 Millionen beziffert [1]; [2].

Die Anfänge der Tumorthherapie datieren zurück ins 18. Jahrhundert und haben sich seitdem bedeutend weiterentwickelt. Beginnend mit der operativen Entfernung des Tumors, der Etablierung der Strahlentherapie im Jahr 1895 und der Einführung der Chemotherapie im Jahr 1943 wurden vielversprechende Erfolge erzielt [3]. Trotzdem zeigen die aktuellen Behandlungsstrategien nicht nur ein zum Teil ungenügendes Therapieansprechen, sondern sowohl akute, wie auch Langzeit-Nebenwirkungen wie Chemotherapietoxizität, ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Zweitmalignomen und akute Beeinträchtigungen je nach Tumorlokalisation [4]. Aufgrund dessen und wegen des erwarteten Anstiegs der neudiagnostizierten Tumorerkrankungen auf bis zu 22 Millionen in den folgenden zwei Jahrzehnten ist es dringend erforderlich, neue therapeutische Strategien zu entwickeln [1].

Das wachsende Gebiet der Gentherapie bietet dafür eine Vielzahl von potentiellen neuen Therapiemöglichkeiten und beinhaltet jede Strategie, welche durch genetische Modifikation von Zellen eine Erkrankung zu lindern oder zu heilen beabsichtigt. Das transportierte genetische Material kann Gene, Genabschnitte oder Oligonukleotide enthalten [3].

Obwohl die Gentherapie immer noch ein teils experimentelles Verfahren ist, haben technologische Fortschritte erlaubt, erste Ansätze dieser Therapiestrategie sowohl bei angeborenen genetischen Defekten wie die zystische Fibrose oder die Hämophilie einzusetzen, als auch bei erworbenen Erkrankungen wie AIDS, Diabetes und Krebsleiden [5]. Aktuell werden weltweit über 1800 Gentherapiestudien durchgeführt und die ersten gentherapeutischen Medikamente zur Behandlung onkologischer Erkrankungen sind bereits zugelassen [6]; [7].

Im Bereich der modernen antitumoralen Gentherapie lassen sich drei therapeutische Ansätze, die Immuntherapie, die onkolytische Virotherapie und der Gentransfer unterscheiden. Die

Immuntherapie benutzt genetisch modifizierte Zellen und virale Partikel, um eine Stimulation des Immunsystems zu generieren und damit die Tumorzellen zu zerstören, wie in verschiedenen klinischen Studien und unterschiedlichen Tumorentitäten (beispielsweise Lungen-, Pankreas- und Prostatakarzinomen) gezeigt werden konnte. Bei bereits metastasierten Tumorleiden konnte die onkolytische Virotherapie, welche virale Partikel nutzt die in den Tumorzellen replizieren und dadurch den Zelltod hervorrufen, erfolgsversprechende Ergebnisse liefern. Der Gentransfer als neueste Therapiemodalität basiert auf dem Gentransfer von Apoptose-, Suizid-, Antiangiogenese- und immunstimulatorischen Genen [8] in die Tumorzellen oder das umliegende Gewebe mittels unterschiedlicher Gentransfermethoden und führt somit zum Zelltod oder verlangsamt das Tumorwachstum [4].

Die verschiedenen aktuell angewandten Gentransfermethoden beinhalten virale (Adeno-, Retro-, Lentiviren) und nicht virale Vektoren (Protein Transduction Domains [PTDs], Liposome, Immunoliposome, Polymere), wie auch biologische oder chemische Methoden der transienten oder stabilen Transfektion von Zellen. Aufgrund ihrer hohen Transduktionseffizienz sind modifizierte Viren eines der meistgenutzten Transduktionssysteme [5]. Der virale Gentransfer ist jedoch mit einer Reihe von Limitationen behaftet. Das mutagene Risiko potentiell fehlerhaft eingesetzter Gene nach retroviralem Gentransfer, ein inadäquates Tumortargeting, eine limitierte Verfügbarkeit von virusspezifischen Rezeptoren auf den Tumorzellen [8], die Stimulation einer Immunantwort, das Fehlen einer Tumorselektivität [9] und die hohen Produktionskosten [5], sind Probleme die überwunden werden müssen. Deshalb ist die Etablierung alternativer Formen des Gentransfers erforderlich, welche höchstmögliche Effektivität bei gleichzeitig minimalem Toxizitätsrisiko bieten.

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften haben sich in den letzten Jahren mesenchymale Stammzellen (MSC) als neue Gentransfervehikel etabliert und in vielen Studien erfolgreich ihr Anwendungspotential gezeigt.

1.2 Stammzellen

1.2.1 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Mesenchymale Stamm- oder Stromazellen wurden als erstes im Jahr 1968 von *Friedenstein et al.* im menschlichen Knochenmark als Fibroblasten-ähnliche, Kolonien formende Zellen identifiziert. Er nannte diese Zellen Knochenmarkfibroblasten oder Stromamechanozyten [10].

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Fortschritte in der Stammzellforschung erzielt. Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung dieser besonderen Zellpopulation wurden etabliert und daraus entstand das Problem der korrekten Namensgebung. Obwohl *Caplan et al.* [11] bereits im Jahr 1991 als erste den Begriff der mesenchymalen Stammzellen (MSC) eingeführt haben, ist das Führen der Bezeichnung „mesenchymale Stammzelle“ oder „mesenchymale Stromazelle“ (mit der gleichen Abkürzung MSC) laut International Society of Cellular Therapy an die Erfüllung verschiedener Kriterien gebunden. Als erstes müssen die Zellen auf Plastikoberflächen adhären können wenn sie unter standardisierten Bedingungen kultiviert werden. Zweitens müssen sie verschiedene Zelloberflächenmarker exprimieren und drittens müssen sie das Potential haben, sich *in vitro* in Zellen mesenchymalen Ursprungs zu differenzieren [12].

MSC können leicht aus dem Knochenmark gesunder Spender, durch ihre Adhäsionskapazität auf Plastikoberflächen [13] isoliert werden, lassen sich leicht expandieren und mit exogenen Genen transfizieren [14]. Die Anzahl an MSC verringert sich im Laufe des Lebens. Die größte Anzahl besitzen Neugeborene bis sie sich im Alter von 80 Jahren auf die Hälfte vermindert haben [15]. In *in vitro* und *in vivo* Experimenten erfolgte die weitere Charakterisierung dieser Zellen [16]; [17].

1.2.2 Charakterisierung von MSC

Mesenchymale Stammzellen sind eine heterogene Zellpopulation, die nicht allein durch einen einzigen spezifischen Marker oder eine isolierte Untersuchung charakterisiert werden kann [18].

Vielmehr ist die Expression von Oberflächenmarkern wie z.B. CD 29, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, CD 106, CD 117, CD 166 und STRO-1, Sca-1 [17]; [19]; [20]; [21]; [22]; [23]; [24] oder die fehlende Expression von CD 11b, CD 14, CD 31, CD 33, CD 34, CD 45, CD 77, CD 133, und von HLA-DR Oberflächenmolekülen [17]; [12]; [25]; [26] erforderlich. Zusätzlich

sezernieren sie eine Anzahl von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin, Kollagen und Proteoglykane, Zytokine und sowohl hämatopoetische als auch nicht hämatopoetische Wachstumsfaktoren, die mit ihrer Funktion und Zellinteraktionen im Knochenmarksstroma assoziiert sind. Darüber hinaus sezernieren sie Interleukine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), leukemia inhibitory factor, stem cell factor (SCF), fetal liver tyrosine kinase-3, thrombopoetin und hepatocyte growth factor (HGF) [27]; [20]; [28]; [29]; [23]; [30].

Obwohl das Knochenmark das eigentliche Reservoir der MSC ist [17], können sie auch aus anderen Geweben wie Retina, Muskel-, Fett- und Lungengewebe, Leber, Innenohr, Synovialmembran, Amnionflüssigkeit, Plazenta, Nabelschnur, peripheres Blut, Haarfollikel und Zähnen isoliert werden [26]; [31]; [32]; [33]; [34]; [35]; [36]; [37]; [38]; [39]; [40]; [41]; [42]; [18]; [23]; [43]; [44]; [45]; [46]; [47]; [48]; [49]; [50]; [51].

Im Knochenmark verweilen sie in Nischen zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen und produzieren die nötigen Zytokine (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15) [52], um die Proliferation des hämatopoetischen Knochenmarks zu stimulieren [53]; [54]; [55]; [56]; [57]; [58]; [59]; [60]; [61]. Die stromale Unterstützung ist essentiell für die Hämatopoese und die zellulären Interaktionen im Knochenmark sind entscheidend für die normale hämatopoetische Funktion [62].

Diese Knochenmarksnischen dienen als Reservoir für MSC [17]; [24]. Dort verbleiben die MSC in inaktiver Form bis sie durch einen spezifischen Stimulus in die periphere Blutbahn ausgeschwemmt werden [63] und durch die folgende Zytokinstimulation ihren Differenzierungsprozess starten können [64]. Zahlreiche Studien [65]; [66]; [67]; [68]; [69]; [70]; [71] konnten zeigen, dass MSC in verletztes Gewebe (ausgelöst durch pathologische Bedingungen wie Bestrahlung, Ischämie, Verletzungen oder Neoplasien) rekrutiert werden können und dort dazu beitragen dieses zu remodellieren und zu erneuern. Obwohl die genauen Mechanismen, wie MSC und die verschiedenen Progenitorzellen ins verletzte Gewebe rekrutiert werden noch unklar sind, ist mittlerweile gut charakterisiert, dass parakrine Faktoren, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Integrine und ihre Rezeptoren eine zentrale Rolle spielen [13]; [72].

Nur ein sehr kleiner Prozentsatz (1 von 10^4 - 10^5 Zellen) der Zellpopulation im Knochenmark sind MSC [17]; [26]. Diese können sich als undifferenzierte Zellen replizieren und in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie z.B. Muskel, Knorpel, Knochen, Fett, Bänder und Sehnen sowie Knochenmarks-Stroma [17] differenzieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sie das

Potential haben sich auch in nicht mesenchymale Zelllinien wie neurale Zellen zu differenzieren [73]; [74].

1.2.3 Klinische Anwendungen von MSC

1.2.3.1 MSC und tissue repair

MSC haben ein hohes wissenschaftliches Interesse ausgelöst, da sie ein hohes Differenzierungspotential aufzeigen und sie zusätzlich die Fähigkeit besitzen, zu den verschiedensten Stellen einer Gewebeverletzung rekrutiert zu werden, wo sie zur Regenerierung des verletzten Gewebes beitragen [75]; [76]; [77].

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass sich aus dem Knochenmark gewonnene MSC nach einem Organtrauma in die entsprechenden Organzellen differenzieren und die Organfunktion verbessern können [78], wie z.B. nach einem Lungentrauma [79]; [80]; [81], einem Herzinfarkt oder bei Herzinsuffizienz [82]; [83]; [84], einer Nierenerkrankung [85]; [86], bei Diabetes [87]; [88], einer Leberschädigung [89]; [90] oder bei neurologischen Erkrankungen [91]. Dazu trägt nicht nur das Differenzierungspotential, sondern auch die Ausschüttung von Mediatoren bei, welche das Mikroenvironment verändern [92]; [93].

Große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielte die Arbeitsgruppe um Horwitz, welche sich mit Patienten mit Osteogenesis imperfecta (OI) befasste. OI ist eine seltene, autosomal dominante Erbkrankheit welche durch Mutationen im Gen für Kollagen Typ 1, das Hauptstrukturprotein des Knochens, hervorgerufen wird [94]. Symptome sind eine generalisierte Osteopenie, welche zu Knochendeformitäten, exzessiver Fragilität und Frakturen sowie kleiner Statur führt [95]; [96]. Es gibt keine kurative Therapie für OI, allein eine symptomatische Therapie mit Biphosphonaten [96]; [94]. In einer ersten durchgeführten Studie zeigten drei Patienten, drei Monate nach allogener Knochenmarkstransplantation von HLA identischen oder single-antigen-mismatched Geschwistern einen deutlichen therapeutischen Effekt trotz eines Engraftment der transplantierten Zellen von nur 1,5 - 2 %. Die im Knochenmark der Empfänger lokalisierten Donor MSC haben funktionelle Osteoblasten geformt, welche zu einer höheren Knochendichte, einem schnelleren Größenwachstum und zur Reduktion von Frakturen beigetragen haben [95]. In einem längeren Follow-up Zeitraum von sechs Monaten nach Transplantation zeigte sich zwar, dass die Wachstumsraten der behandelnden Kinder abnahmen, trotzdem aber höher waren als die der unbehandelten Patienten in der Kontrollgruppe [96].

Dieser erste Erfolg konnte in weiteren Studien reproduziert werden. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auch die Erhöhung der Anzahl der Applikationen und die Applikation eines MSC Boosts der initialen Knochenmarkspender, ohne vorherige myeloablative Therapie positive Effekte auf die Knochenmineralisation und Reduktion der Frakturen erzielt hat [94]. In einer kürzlich durchgeführten Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl MSC wie auch NABMCs (Non-(plastic)-adherent bone marrow cells) eine effektive Therapie der OI darstellen, jedoch ihre klinische Auswirkung über komplementäre Mechanismen ausüben. In einem murinen OI Modell konnte gezeigt werden, dass NABMCs durch ihre Differenzierung in Osteoblasten, Kollagen für die Knochenmatrix beisteuern und MSC, entgegen den initialen Erkenntnissen, einen löslichen Faktor sezernieren, welcher indirekt das Knochenwachstum stimuliert [97].

Diese Versuche haben gezeigt, dass Knochenmarktransplantationen, welche zuvor nicht für Erkrankungen außerhalb des hämatopoetischen Systems eingesetzt wurden, durchaus auch für Defekte mesenchymalen Ursprungs eine Therapiemöglichkeit bieten.

1.2.3.2 MSC und Autoimmunerkrankungen

MSC haben immunsuppressive Eigenschaften, die Fähigkeit, die Immunantwort zu modifizieren und mit fast allen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, wie T- und B- Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, NK Zellen, Mastzellen, Makrophagen und antigenpräsentierende Zellen zu interagieren [98]. Im Einzelnen können sie die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten supprimieren und ihre funktionelle Reaktion modulieren was zu einer reduzierten Produktion von Interferon γ (IFN γ), Interleukin 2 und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), aber zu einer erhöhten Sekretion von Interleukin 4 führt [99]; [100]. Zusätzlich können sie anti-inflammatorische regulatorische T- Zellen induzieren [101], die B-Zell Proliferation und Differenzierung [102]; [103] und die Proliferation und Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen supprimieren [104] und die Maturation von dendritischen Zellen blockieren [105].

Des Weiteren können sie die Zellproliferation beeinflussen und die Immunreaktion mittels löslicher Faktoren wie IL-6, M-CSF, IL-10, TGF β , hepatocyte growth factor (HGF) und Prostaglandin E2 (PGE2) modulieren [99]; [106]; [107]; [78].

Die genaue Erforschung dieser immunmodulatorischen Eigenschaften könnte helfen um refraktäre Autoimmunerkrankungen wie die Graft versus Host Disease (GvHD), systemischer

Lupus erythematoses, Multiple Sklerose und chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu therapieren [108]; [109]; [110]; [111]; [112]; [113].

GvHD ist eine schwerwiegende Komplikation nach autologer Stammzelltransplantation, die die Therapie der Wahl für viele maligne hämatopoetische Erkrankungen ist [114]; [115]; [116]; [109]; [117]; [110]. Steroide sind die Standardtherapie bei der Therapie der schweren, akuten GvHD, jedoch gibt es keine etablierte Therapie für Patienten mit steroidrefraktärer Form. Das Überleben bei dieser Form ist sehr gering [114]; [116]; [118]; [117]; [110], und beträgt nach zwei Jahren circa 10 % [109]; [117]; [119]; [110].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine sichere MSC Applikation bei Erwachsenen und Kindern mit akuter, schwerer steroidrefraktärer GvHD möglich ist [108]; [110]; [109]; [120]; [121]; [122]; [123]; [124]; [125]; [126].

Le Blanc und Kollegen berichteten von einer erfolgreichen Behandlung eines neunjährigen Patienten mit steroidrefraktärer GvHD Grad IV der Leber und des Darms nach allogener Stammzelltransplantation bei akuter lymphatischer Leukämie mittels MSC [108]. Durch eine weitere multizentrische, nicht randomisierte Phase II Studie wurde untermauert, dass die Applikation von MSC eine effektive Therapieoption bei steroidrefraktärer GvHD sein kann. Die MSC stammten von HLA-identischen Fremd Spendern, haploidentischen Familienmitgliedern oder von nicht verwandten HLA-mismatched Spendern. 30 der 55 behandelten Patienten zeigten ein vollständiges Ansprechen und neun Patienten zeigten eine Verbesserung der GvHD, unbeeinflusst von der Herkunft der gespendeten MSCs. Das Überleben der Patienten mit einem vollständigen Ansprechen war signifikant höher und die transplantationsassoziierte Mortalität geringer als bei Patienten mit nur partiellem oder fehlendem Ansprechen auf die MSC Therapie [110].

Auch weitere Arbeitsgruppen berichteten über keine negativen Vorkommnisse während der Therapie mit MSC [122]; [127]. Die Therapie mit MSC scheint eine vielversprechende und sichere Option darzustellen, jedoch gibt es aktuell keine Empfehlungen bezüglich eines genauen Therapieprotokolls. Weitere Studien sind deshalb notwendig um die genauen immunologischen Wirkmechanismen, die genaue Applikationsmenge der MSC und die Häufigkeit der Applikationen zu untersuchen, um diese Therapieoption mit den bereits etablierten konventionellen Therapien zu vergleichen [110].

1.2.3.3 MSC und solide Tumore

Die sechs Kennzeichen von Tumoren, wie von Hanahan und Weinberg 2000 und 2011 beschrieben, also charakteristische Fähigkeiten, die Tumorstromawachstum und metastatisches Potential ermöglichen, bieten eine solide Grundlage, um die Tumorbilogie zu verstehen. Sie beinhalten den Widerstand des Zelltodes, das Anregen der Angiogenese, das Ermöglichen der replikativen Immortalität, die Aktivierung der metastatischen Fähigkeit, das Ausweichen der Wachstums-suppression und die Erhaltung von Proliferationssignalen [128]; [129].

Tumore bestehen nicht nur aus malignen Tumorzellen, sondern zusätzlich aus einem „benignen“ Kompartiment, dem sogenannten Tumorstroma [128]; [130]. Dieses Tumorstroma spielt eine Schlüsselrolle für das Tumorstromawachstum, die Tumorstromaangiogenese und das metastatische Potential eines Tumors, deshalb ist es ein wichtiges Ziel der Tumorthherapie [130]; [71]; [18]; [131]; [132]. Die meisten, wenn nicht alle soliden Tumore besitzen einen gewissen Grad an Tumorstroma, welches auch einen Indikator für die Prognose darstellt [130]; [133]; [134]; [135]; [136].

Das Tumorstroma besteht aus verschiedenen Zelltypen, vorwiegend aus infiltrierenden inflammatorischen Zellen und Stromafibroblasten, auch tumorassoziierten Fibroblasten (TAF) [137]; [138]; [139], oder carcinomassoziierten Fibroblasten (CAF) [140] genannt, die direkt das Tumorstromawachstum im Rahmen der Karzinogenese unterstützen. Zusätzlich beinhaltet es Gefäße, perivaskuläre Zellen und die extrazelluläre Matrix [141]; [142]; [143]; [144], liefert strukturelle Unterstützung für die malignen Zellen, moduliert die Tumorumgebung, sezerniert Zytokine und Wachstumsfaktoren und beeinflusst das biologische Verhalten, einschließlich der Aggressivität des Tumors [145]; [130].

Sogar der kleinste Tumor benötigt eine adäquate Gefäßversorgung zum Überleben [146]. Dieser Prozess beinhaltet die Interaktion von unterschiedlichen Zellarten, einschließlich Makrophagen, Fibroblasten (TAFs) und endothelialen Zellen, welche durch Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) zur Angiogenese stimuliert werden [147]; [148]; [149]; [150]. Obwohl der genaue Ursprung der TAF unklar bleibt, zeigen Studien, dass sie entweder von lokalen Fibroblasten abstammen [151]; [152] oder aber der Beitrag von zirkulierenden MSC in dem heterogenen Fibroblastenpool sind [130]; [70]; [71]; [153]; [14]; [154]; [155]; [156].

Laut Dvorak *et al.* [157] können Tumore als nie heilende Wunden angesehen werden, wie auch als Orte einer kontinuierlichen Inflammation und Zytokinproduktion. Durch eine Gewebeverletzung oder Inflammation werden typischerweise inflammatorische Zytokine freigesetzt, welche zu einer Rekrutierung von MSC in das verletzte Gewebe führen. Obwohl

der genaue Mechanismus des MSC Homing zu diesem Ort noch nicht vollständig geklärt ist, zeigen Untersuchungen, dass das Mikromilieu eines Tumors, bestehend aus einer großen Anzahl von inflammatorischen Zellen, die Rekrutierung der MSC über unterschiedliche lösliche Faktoren stimuliert, die aus den Tumor- und inflammatorischen Zellen sezerniert werden. Zu diesen zählen epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF-A), fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF), stromal cell derived factor (SDF-1 α), IL-8 und IL-6, hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor (TGF- β 1), urokinase-type plasminogen activator (uPA) und monocyte chemotactic protein (MCP-1) [158]; [159]; [160]. Zusätzliche Untersuchungen konnten zeigen, dass MSC ein ähnliches Migrationsverhalten wie Leukozyten aufweisen. Dabei spielt TNF- α aktiviertes Endothel eine Rolle, welches über die Signaltransduktionswege VCAM-1 und GPCR aktiviert wird. Hohe TNF- α Level stimulieren somit endotheliale Zellen zur Expression und Präsentation einer Reihe von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, welche die MSC Adhäsion und Migration steigern [161]. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um die MSC Migration genauer zu untersuchen und somit die therapeutische Effizienz zu verbessern.

1.2.3.4 MSC als Gentranfervehikel

Basierend auf ihrer Fähigkeit zur Migration und Rekrutierung ins Tumorstroma stellen MSC exzellente Tranfervehikel dar, um therapeutische Agentien an den Ort des Tumorwachstums zu transportieren [130]; [5]. Viele Arbeitsgruppen inklusive unserer eigenen Gruppe konnten zeigen, dass MSC zu verschiedenen Karzinomen wie Brust-, Kolon-, Ovarialkarzinomen, Gliomen, Melanomen und Kaposi Sarkomen [162]; [153]; [71]; [163]; [164]; [165] [166]; [131]; [132]; [167] und zu Tumormetastasen [168]; [169]; [170]; [171]; [172]; [159] migrieren. Dabei werden sie selektiv ins Tumorstroma rekrutiert und differenzieren sich in diverse, Tumorstroma-assoziierte Zelltypen [167]; [173]; [131]; [132]; [174].

Zu den herausragenden Eigenschaften, welche MSC zu solch eindrucksvollen Gentranfervehikeln machen, gehören ihre leichte Isolierbarkeit und *in vitro* Expansion und ihre Hypoimmunogenität. Außerdem können sie autolog transplantiert und leicht genetisch modifiziert werden, z.B. durch Transduktion mit viralen Vektoren welche ein therapeutisches Gen oder cDNA enthalten und können so als molekulare Tranfervehikel genutzt werden [8]. Zahlreiche Studien konnten bereits das Potential von MSC als Gentranfervehikel zeigen [70]; [71]; [170]; [153]; [175]; [176]; [168]; [169]; [162].

Studený et al. konnten zeigen, dass MSC selektiv in den Tumor rekrutiert werden, Teil des Tumorstromas in Form von Stromafibroblasten werden und dort therapeutische Agentien wie IFN- β exprimieren. Dies führte nach i.v. Applikation von IFN- β -MSC in metastatischen Mammakarzinom- und Melanomxenotransplantat-Modellen zu einem supprimierten Wachstum der intrapulmonalen Metastasen [70]; [71]. Über ähnliche Ergebnisse berichteten *Nakamizo et al.* in einem Gliom-Mausmodell. Fluoreszenzmarkierte MSC konnten sowohl nach regionaler (ipsilateraler und kontralateraler Injektion in die Arteria carotis) wie auch nach intrazerebraler Injektion in die kontralaterale Hemisphäre in den Gliomen detektiert werden. Nach Applikation von genetisch modifizierten MSC welche IFN- β exprimierten, zeigte sich ein signifikant verlängertes Überleben [153].

Die Arbeitsgruppe um *Loebinger et al.* konnte zeigen, dass MSC die genetisch modifiziert wurden um TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) zu exprimieren, im subkutanen Xenograft-Modell eine signifikante Tumorreduktion hervorgerufen haben. In einem Metastasenmodell konnten systemisch applizierte TRAIL-MSC in den pulmonalen Metastasen detektiert werden und in 38 % der Mäuse eine komplette Metastasenelimination induzieren [168].

Zischek et al. in der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. rer. nat. Nelson hat in einem pankreatischen Xenotransplantat-Mausmodell gezeigt, dass MSC aktiv in das Tumorstroma rekrutiert werden. Diese MSC waren stabil mit dem Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSV-TK) Gen, einem Suizid-Gen transfiziert, welches unter der Steuerung des RANTES (Regulated on Activation, normal T-cell Expressed and presumably secreted) Promoters stand. Nach Applikation von Ganciclovir, einem Prodrug das in Kombination mit dem TK Genprodukt ein potentes Toxin bildet, kam es zu einer signifikanten Reduktion der Primärtumore und deren Metastasen [167]. Ähnliche Ergebnisse konnte auch *Niess et al.* beim hepatozellulären Karzinom erzielen. Nach i.v. Injektion von genetisch modifizierten MSC, die das HSV-TK Gen, unter Steuerung des RANTES Promotors exprimierten, und nach Applikation von Ganciclovir zeigte sich eine Tumorreduktion von 56,4 % bei den tumortragenden Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe [174].

Ein weiterer Tumorstroma spezifischer Therapieansatz, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Nelson unter Verwendung des Tie2 (Tyrosine Kinase with immunoglobuline-like and EGF-like Domains 2) Promoters/Enhancers untersucht [177]. Das Tie2 Gen kodiert für eine Angiopoetin Rezeptor Tyrosin Kinase [178] und ist essentiell für die Formation von Blutgefäßen im Rahmen der Tumorangiogenese. Die Promoter und Enhancer Sequenzen von Tie2/Tek kontrollieren die Expression dieser Gene während der Neovaskularisation im

endothelialen Milieu und Tie2 wird in vaskulären „Hot Spots“ hochreguliert [179]. Die Neoangiogenese ist ein wesentlicher Prozess in der Transition eines Tumors von einem Zellhaufen zu einer makroskopisch sichtbaren Raumforderung [180]; [181]. Der limitierende Faktor für das Tumorwachstum stellen somit die endothelialen vaskulären Zellen und folglich die Tumervaskularisation dar, welche auch einen idealen Angriffspunkt für die selektive Tumorthherapie bieten [182].

Conrad et al. und *Niess et al.*, ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Nelson konnten in verschiedenen Tumormodellen wie Pankreas-, Mamma- und Leberkarzinomen zeigen, dass MSC aktiv ins Gefäßbett rekrutiert werden und dort unter der Kontrolle des Tie2 Promotors entweder ein Reporter- (red fluorescent Protein, RFP) oder ein Therapiegen (HSV-TK) exprimieren. Nach Applikation des Prodrug Ganciclovir entstand in Kombination mit dem TK Genprodukt ein potentes Toxin, welches eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums und daraus resultierend eine Verlängerung des Überlebens induzierte [182]; [174].

Auf dem Boden dieser vielversprechenden Vorarbeiten mit genetisch modifizierten MSC und der tumorspezifischen Gentherapie wurde an der LMU München die erste klinische Phase I/II Studie zur Anwendung des HSV-TK Gens nach MSC vermitteltem Gentransfer zur Therapie von rezidivierenden und metastasierten Adenokarzinomen des gastroenteralen und hepatobiliären Systems genehmigt [183].

1.3 Der Natrium - Iodid Symporter

1.3.1 Molekulare Charakterisierung

Der aktive Transport von Iodid in die Schilddrüse wird durch ein intrinsisches Membranprotein, den Natrium-Iodid Symporter (NIS) vermittelt. Dieser befindet sich nicht nur in der Schilddrüse, sondern auch in extrathyreoidalen Organen wie Speichel- und Tränendrüsen, Choroidaler Plexus, Ziliarkörper, Magen, Nieren, Plazenta und laktierender Brustdrüse [184]; [185]; [186]; [187]; [188]; [189]; [190]. Das NIS Gen ist auf dem Chromosom 19p12-13.2 lokalisiert und kodiert für ein membranständiges Glykoprotein von 643 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 70 bis 90 kDa je nach Glykosilierungslevel und besteht aus 13 Transmembrandomänen [191]; [192] (siehe Abb. 1). Primär wurde im Jahr

1996 das NIS Gen der Ratte kloniert [184], gefolgt von der Klonierung des humanen NIS [186] und des murinen NIS [193].

NIS gehört zur Familie der sodium/solute Proteine, zu welcher auch der Na-Glukose Cotransporter (SGLT), der Na-Myositol Cosymporter (SMIT), der Na-Proline Symporter (NPT oder PutP), der Na-Multivitamintransporter (SMVT), der high affine Cholin-Transporter und der Na-Monocarboxylat-Transporter (SMCT) gehören [194].

Die funktionelle Expression von NIS in der Schilddrüse ist verantwortlich für die Akkumulation von Iodid, einem essentiellen Bestandteil der Schilddrüsenhormone, Triiodthyronin (T3) und Tyroxin (T4). Diese sind für den Stoffwechsel aller Organe von unerlässlicher Bedeutung und spielen bei der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle [195]; [196]. Das Iodid wird durch die Funktion von NIS für die Schilddrüsenhormonsynthese in der Schilddrüse bereitgestellt und dort etwa 20 - 40-fach konzentriert [195].

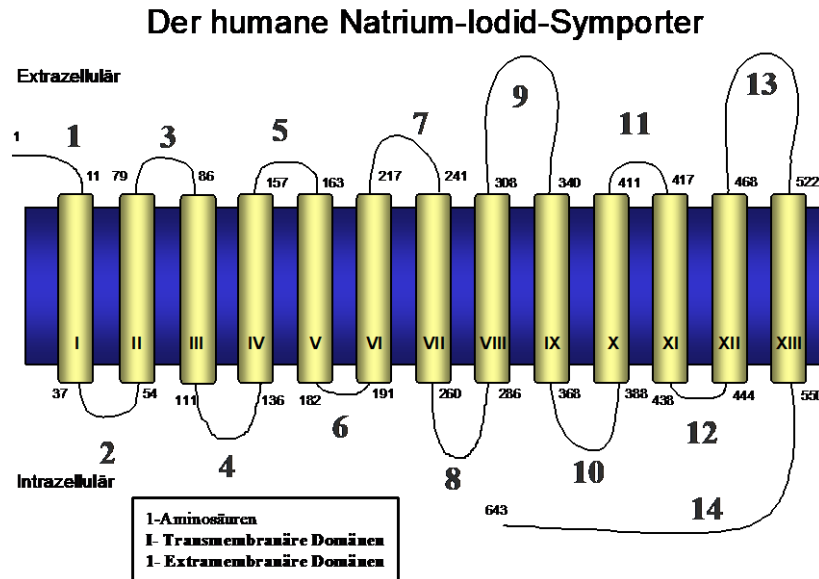


Abb. 1: Der Natrium-Iodid Symporter: ein intrinsisches Membranprotein mit 13 transmembranären- und 14 extramembranären Domänen aus [197].

1.3.2 Regulation des Natrium-Iodid Symporters

Der an der basolateralen Membran der Schilddrüsen-Follikelzellen lokalisierte Natrium-Iodid-Symporter transportiert durch einen durch die Na^+/K^+ ATPase aufrechterhaltenen Na-Gradienten 2 Na^+ -Ionen und ein I^- -Ion in das Zellinnere. Dementsprechend ist der Natrium-Iodid Symporter durch den Na^+/K^+ ATPase Hemmer Ouabain hemmbar, sowie durch weitere kompetitive Inhibitoren wie Thiozyanat und Perchlorat [191]; [196]; [192]. Iodid ist nicht das einzige Ion das über NIS transportiert wird; dazu zählen auch weitere Anionen wie ClO_3^- , SCN^- , SeCN^- , NO_3^- , Br^- , TcO_4^- , ReO_4^- , At^- [198]; [199]. Bei der Regulation von NIS spielt das TSH, also das in der Hypophyse gebildete Thyreoidea stimulierende Hormon (TSH) eine zentrale Rolle. Über den Adenylatzyklase-cAMP-Weg, wird die NIS Gen- und -Protein Expression stimuliert [191]; [192]; [199]; [200]; [201]. Dem TSH fällt darüber hinaus eine wesentliche Rolle beim korrekten Plasmamembran Targeting des NIS Proteins zu, welches für seine funktionelle Aktivität entscheidend ist. Die Phosphorylierung des NIS Proteins, welche ebenfalls über das TSH reguliert wird, scheint auch von essentieller Bedeutung für diesen Prozess zu sein [199].

Als Inhibitoren der funktionellen NIS Expression wurden Östradiol und Glykokorticoide sowie verschiedene Zytokine identifiziert, wie Transforming growth factor β -1 (TGF- β 1), Tumor-Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin (IL)-1 α , Interferon (IFN) γ , IL-1 β , IL-6, die besonders bei der Pathogenese von Schilddrüsenenerkrankungen autoimmunologischer Natur und des „Euthyroid Sick Syndroms“ eine Rolle spielen [191]; [192]; [202]; [203]. Auch Iodid zeigt einen inhibitorischen Effekt auf die NIS Gen- und Proteinexpression, ein Phänomen welches die molekulare Grundlage des Escape Phänomens des Wolff Chaikoff Effekts darstellt [192]; [202]; [204]. Wolff und Chaikoff haben bereits im Jahr 1948 in einem tierexperimentellen Modell zeigen können, dass eine Blockade der thyreoidalen Organifizierung von Iodid durch eine erhöhte Iodkonzentration im Plasma hervorgerufen werden kann. Dieser Effekt ist jedoch nur ein transientes Phänomen, weil sich die Schilddrüse an einen langanhaltenden Iodexzess anpasst und die Schilddrüsenhormonsynthese wiederaufnimmt. Dies wird als das Escape Phänomen vom Wolff-Chaikoff Effekt bezeichnet [205].

Nachdem Iodid an der basolateralen Membran der Schilddrüsenfollikelzelle aufgenommen wurde, wird dieses an der apikalen Membran über noch nicht ganz im Detail geklärte Mechanismen ins Schilddrüsenkolloid abgegeben. Zu diesem Prozess trägt Pendrin, das Pendred-Syndrom Genprodukt, ein Chlorid-Iodid-Symporter neben weiteren unspezifischen Ionenkanälen bei [192]; [206].

Während des Prozesses der Iodorganifizierung wird Iodid durch das Katalysatorenzym Schilddrüsenperoxidase (TPO) oxidiert und an Tyrosylreste des Thyreoglobulins (Tg) gebunden, welches im Kolloid der Schilddrüsenfollikelzelle lokalisiert ist. Durch Kopplung einer entsprechenden Menge an Iodtyrosylresten werden die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) gebildet und im Schilddrüsenkolloid gespeichert. Bei entsprechendem Bedarf im Körper werden diese Hormone hydrolysiert und in die Blutbahn abgegeben [191]; [192]; [196], siehe Abb. 2.

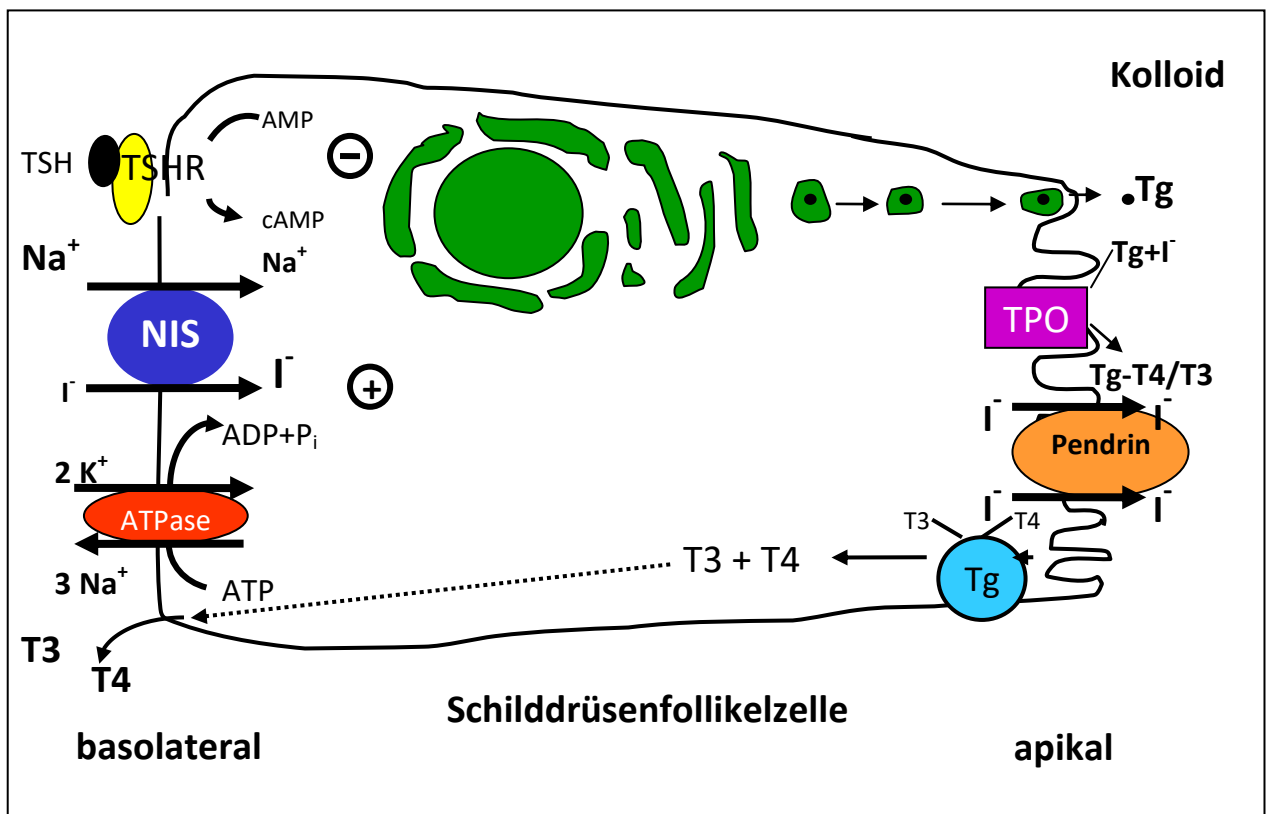


Abb. 2: Schematische Darstellung der Iod Aufnahme, des Iod Transportes und der Organifizierung in Schilddrüsenzellen. NIS: Natrium-Iodid Symporter, TSHR: TSH Rezeptor, Tg: Thyreoglobulin, TPO: Schilddrüsenperoxidase, aus [197].

1.3.3 Endogene NIS Expression in der Schilddrüse

1.3.3.1 Natrium-Iodid Symporter bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen

Die NIS Expression im normalen Schilddrüsengewebe wird hauptsächlich an der basolateralen Membran einzelner Schilddrüsenfollikelzellen immunhistochemisch detektiert und zeigt ein heterogenes Verteilungsmuster [207]; [208]. Im Gegensatz dazu findet sich bei Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen wie Morbus Basedow eine starke basolaterale NIS Expression in allen Schilddrüsenfollikelzellen [201]; [207]; [208]; [209]. Die erhöhte NIS Expression beim Morbus Basedow wird durch hohe Spiegel von TSH-Rezeptor-stimulierenden Antikörpern erklärt, welche über eine erhöhte NIS Expression zu einer diffus erhöhten Radionuklidanreicherung in der Schilddrüsenszintigraphie führen [191]; [201]; [207]; [208]; [209]; [191].

Bei der Hashimoto Thyreoiditis wird eine niedrige Expression mit ähnlicher Lokalisation wie bei der gesunden Schilddrüse gesehen, jedoch auffallend häufig in Nähe von Lymphozyteninfiltraten [195]; [208]. Die niedrige NIS Expression bei der Hashimoto Thyreoiditis ist auf die Wirkung von Zytokinen zurückzuführen, welche pathogenetisch für diese Erkrankung sind und zu einer reduzierten NIS Expression führen, welche bildmorphologisch mit einer verminderten Radionuklidaufnahme in der Schilddrüsen-Szintigraphie vereinbar ist [202]; [192].

1.3.3.2 Natrium-Iodid Symporter bei Schilddrüsenknoten

Autonome Adenome oder „warme Knoten“ der Schilddrüse weisen einen erhöhten ^{99m}Tc -Pertechnetat Uptake in der Schilddrüsenszintigraphie auf dem Boden einer gesteigerten NIS Expression auf RNA und Protein Ebene auf [209]; [210]; [211]. Im Gegensatz dazu zeigen „kalte Knoten“ eine reduzierte Expression von NIS RNA und NIS Protein, zusätzlich zu einem defekten Zellmembrantargeting des NIS Proteins, beides Faktoren welche die reduzierte Radionuklidaufnahme in der Schilddrüsen-Szintigraphie erklären [209]; [210]; [212]. Durch die erhöhte ^{99m}Tc -Pertechnetat bzw. ^{131}I Aufnahme der autonomen Adenome und des Morbus Basedow ergibt sich nicht nur die Möglichkeit der Diagnostik mittels Szintigraphie, sondern auch eine äußerst effiziente und nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeit mittels Radioiodtherapie mit ^{131}I [191].

1.3.3.3 Maligne Schilddrüsenerkrankungen

Bei Schilddrüsenkarzinomen und deren Metastasen ist die Iodaufnahmeaktivität die Grundlage für Radioiod-Diagnostik und -Therapie [195] nicht nur des Primarius, sondern auch für die postoperative Lokalisation und Ablation von verbliebenem Schilddrüsenkarzinomgewebe, Metastasen oder Rezidiven [191]; [213]; [214].

Die überwiegende Anzahl der malignen Schilddrüsentumore weist ein erniedrigtes NIS Expressionsmuster auf, welches sich in einer reduzierten Radioiodaufnahme widerspiegelt [195]. Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die reduzierte Radionuklidaufnahmeaktivität in den meisten Schilddrüsenkarzinomen auf eine reduzierte NIS-RNA und -Proteinexpression zurückzuführen ist [191]; [192]; [185]; [186]; [207]; [215]; [216].

Im Gegensatz dazu zeigten *Saito et al.* und *Dohan et al.* eine signifikant erhöhte NIS Expression [217]; [218]. *Dohan et al.* konnten zeigen, dass in 70 % der 57 immunhistologisch untersuchten Schilddrüsenkarzinomproben zwar eine erhöhte NIS Proteinexpression vorlag, aber NIS zusätzlich zur Plasmamembran vor allem auch intrazellulär lokalisiert war. Dies könnte erklären warum sich trotz erhöhter NIS Expressionslevel eine reduzierte Iodakkumulation zeigte und würde den Rückschluss auf ein defektes Membrantargeting des NIS Proteins im Rahmen der malignen Transformation zulassen [191]; [218].

1.3.4 Endogene NIS Expression in der Brustdrüse

Außer der Schilddrüse konnten weitere Organe, insbesondere die laktierende Brustdrüse, identifiziert werden, in denen eine signifikante NIS Expression nachgewiesen werden kann [188]; [190]. Die physiologische Aufgabe von NIS in der laktierenden Brustdrüse besteht darin, Iodid in der Muttermilch anzureichern und so dem Neugeborenen zur Schilddrüsenhormonsynthese zur Verfügung zu stellen [191]; [196]; [190].

Die Arbeitsgruppe um Tazebay konnte mittels Western Blot Analyse und Immunhistochemie nachweisen, dass es sich beim NIS Protein der laktierenden Brustdrüse um ein Glykoprotein mit einer Größe von 75 kDa handelt, das ähnlich wie NIS der Schilddrüse an der basolateralen Membran der Alveolarepithelzelle lokalisiert ist [191]; [190].

Zusätzlich zur Expression des NIS Proteins in der laktierenden Brustdrüse konnte durch Tazebay und Knostmann [190]; [219] eine funktionell aktive NIS Expression auch in Mammakarzinomen der Maus mittels Immunhistochemie, Western Blot Analyse und Szintigraphie nachgewiesen werden. Interessanterweise kommt es im malignen

Brustdrüsengewebe zu einem Verlust der basolateralen Orientierung, so dass das NIS Protein zusätzlich zur Plasmamembran auch intrazellulär nachgewiesen werden konnte [191]; [190]; [220].

1.3.5 NIS als Reportergen

Die endogene Expression von NIS dient schon seit vielen Jahrzehnten als molekulare Grundlage der Schilddrüsenszintigraphie. Technologische Fortschritte im Bereich der Nuklearmedizin, der Kernspintomographie und des optischen Imagings haben im letzten Jahrzehnt zu einer Vielzahl neuer Entwicklungen im Bereich der molekularen Bildgebung, die nicht invasives Imaging endogener und exogener Genexpression zum Ziel hat, geführt. Außerdem ist im Rahmen gentherapeutischer Ansätze das genaue, nicht invasive Monitoring der *in-vivo*-Biodistribution, Replikation und Elimination viraler Vektoren, sowie Lokalisation, Ausmaß und Dauer der Transgen-Expression unerlässlich für die exakte Planung klinischer Gentherapiestudien. Die Klonierung von NIS hat uns dabei ein äußerst vielversprechendes Reporter-Gen bereitgestellt, da es ein körpereigenes, nicht immunogenes Protein, mit einer klaren Biodistribution im menschlichen Körper ist. Es vermittelt den selektiven Transport leicht verfügbarer Radionuklide wie ^{131}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{124}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{188}Re , ^{211}At und ^{18}F -TFB [191]; [221].

Für diagnostische Zwecke wird im Rahmen der Routine Schilddrüsen-Szintigraphie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat verwendet, welches ebenfalls über den Natrium-Iodid-Symporter transportiert wird, jedoch aufgrund der geringen Halbwertszeit (6h) und der reinen Emission von γ -Strahlen keine wesentlichen Nachteile für die Patienten bietet. ^{131}I wird neben seiner therapeutischer Anwendung aufgrund einer längeren Halbwertszeit von 8 Tagen und der Emission von β -Strahlen nur zur diagnostischen Ganzkörper-Szintigraphie, sowie insbesondere zur Post-Therapie-Ganzkörperszintigraphie im Rahmen der Schilddrüsenkarzinomnachsorge verwendet [191]. ^{124}I zeichnet sich durch ein komplexes Emissionsspektrum mit dualer Emission von β - und γ -Strahlen aus, bei dem es in 23 % der Zerfälle zu einer Positronenemission kommt und wird als NIS PET Tracer verwendet [222].

Der Fortschritt in der radiologischen und nuklearmedizinischen Bildgebung eröffnet die Möglichkeit, neben zweidimensionalen Verfahren wie der ^{123}I - oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Szintigraphie, auch dreidimensionale Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Single Photon Emissions Computer Tomographie (SPECT) zu nutzen. Eine mögliche Beschränkung in der Auflösung kann durch Kombination mit einer CT oder MRT Untersuchung

überwunden werden. Mehrere Arbeitsgruppen haben das Potential von NIS als Reportergen in verschiedenen Anwendungsbereichen untersucht, wobei die *in vivo* nachgewiesene Radioiodakkumulation mit den Ergebnissen der *ex vivo* Messungen mittels Gamma-Counter, sowie der NIS-mRNA- und -Protein-Analyse korrelierte [191]; [223]; [224]; [221]; [225]; [226]; [227].

1.3.6 Exogene NIS Expression mittels Gentransfer

Die Klonierung und Charakterisierung des NIS Gens im Jahre 1996 hat neue Möglichkeiten zu gentherapeutischen Entwicklungen für die Behandlung thyreoidaler und extrathyreoidaler Tumore eröffnet [195]. Die Maximierung tumorspezifischer Zytotoxizität bei weitgehender Schonung gesunder Gewebe ist das Ziel jedes onkologischen Therapieansatzes.

Für die Gentherapie ergibt sich hierfür die überaus elegante Methode des transkriptionellen Targetings zur tumorselektiven Expression therapeutischer Gene unter Verwendung tumorspezifischer Promotoren. Durch gezielte Expression von funktionsfähigem NIS in extrathyreoidalen Tumorzellen erwerben diese die Fähigkeit, Iodid aus dem Blut aufzunehmen und können dann ähnlich wie in der Schilddrüse mit Radioiod behandelt werden. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass sich die Radioiodtherapie nun auch bei extrathyreoidalen Tumoren als eine sichere und nebenwirkungsarme Behandlungsmodalität etablieren könnte [191]; [195].

In einer Reihe von Untersuchungen nach NIS Transduktion, konnte unter Verwendung verschiedener Gentransfermethoden wie Elektroporation, Liposomen und viraler Vektoren, die Iodakkumulation in verschiedenen Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden [191]; [192]; [197]. Im Jahr 1997 zeigten *Shimura et al.* als erste Arbeitsgruppe in der Schilddrüsenkarzinomzelllinie FRTL der Ratte, dass nach unspezifischer NIS Transfektion mittels Elektroporation eine Iodakkumulation *in vitro* wie auch *in vivo* zu verzeichnen war [228]. Seitdem haben mehrere Arbeitsgruppen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchen weitere entscheidende Fortschritte erzielt.

Sowohl *Mandell et al.* als auch *Boland et al.* konnten an verschiedenen extrathyreoidalen Zelllinien wie Melanomzellen, Leber-, Kolon-, Ovarial-, Mamma- Zervix-, Prostata- und Lungenkarzinomzellen nach retroviralem, respektive adenoviralem Transfer des NIS Gens der Ratte eine Iod Akkumulation sowie einen selektiven zytotoxischen Effekt nach ^{131}I Applikation nachweisen [229]; [230].

Spitzweg et al. ist es als erste Arbeitsgruppe gelungen, unter Steuerung des PSA (Prostata-spezifisches Antigen) Promoters, der für die Prostata-spezifische, androgenabhängige Expression von PSA verantwortlich ist, in humanen Prostataadenokarzinomzellen (LNCaP) durch gewebespezifische NIS Expression eine Iodaufnahmeaktivität zu induzieren. Obwohl Prostataadenokarzinomzellen keine Organifizierung des aufgenommenen Iods zeigen, konnte ein signifikant therapeutischer Effekt von ^{131}I sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* nachgewiesen werden. Im Prostataadenokarzinommausmodell, bestehend aus mit hNIS-DNA stabil transfizierten LNCaP Xenotransplantaten, konnte nach einmaliger intraperitonealer Applikation einer therapeutischen Dosis von 3 mCi (111 MBq) ^{131}I eine signifikante Tumorreduktion von bis zu 99 % \pm 0,6 % in der Therapiegruppe beobachtet werden [195]; [231]; [232]. Zusätzlich konnte in weiteren *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass durch die zusätzliche Behandlung mit Retinsäure und dem synthetischen Glycocorticoid Dexamethason sowohl die NIS Expression in den Prostataadenokarzinomzellen als auch die therapeutische Effizienz von ^{131}I gesteigert werden konnte [233]; [234].

In weiterführenden Untersuchungen erfolgte ein Adenovirus vermittelter *in vivo* NIS Gentransfer in Prostataadenokarzinom Xenotransplantatentumoren. *Spitzweg et al.* verwendeten hierfür ein replikationsinkompetentes Adenovirus unter der Steuerung des CMV Promoters und konnten durch *in vivo* NIS Gentransfer eine Radioiodakkumulation von 20,2 % \pm 11,4 % der gesamt applizierten ^{123}I Dosis erreichen. Des Weiteren wurde nach therapeutischer Applikation von 3 mCi (111 MBq) ^{131}I eine durchschnittliche Tumorreduktion von 84 % \pm 12% erreicht [235]. Mit dem Ziel eine Minimierung der extratumoralen Zytotoxizität zu erreichen und einen geeigneten Vektor für klinische Studien zu etablieren, erfolgte durch *Kakinuma et al.* die Entwicklung und Charakterisierung eines prostataspezifischen Adenovirusvektors unter Verwendung eines prostataspezifischen Probasin Promotor Fragmentes (Ad5-PB-NIS) [236]. In Vorbereitung auf die erste klinische Phase I Studie eines adenoviral vermittelten NIS Gentransfers für die Therapie des Prostataadenokarzinoms wurde in der Arbeitsgruppe um J.C. Morris der adenovirale NIS Gentransfer an Hunden untersucht [237].

Zusätzlich zu den Arbeiten am Prostataadenokarzinommausmodell haben verschiedene Arbeitsgruppen inklusive unserer, die tumorspezifische Expression von NIS in unterschiedlichen Tumormodellen z.B. beim Leberkarzinom [238]; [239]; [240]; [241]; [242], beim medullären Schilddrüsenkarzinom [243], beim Kolonkarzinom [244], beim Mammakarzinom [245], bei neuroendokrinen Tumoren [246], beim Multiplen Myelom [247], beim Ovarialkarzinom [248] und beim Pankreaskarzinom [249] untersucht. In der eigenen

Arbeitsgruppe konnten sowohl *Scholz et al.* an humanen Kolonkarzinomzellen *in vitro* unter Steuerung des Promoters für das carcinoembryonale Antigen (CEA), wie auch *Cengic et al.* beim medullären Schilddrüsenkarzinom *in vitro* mithilfe des Calcitonin Promoters, einen therapeutischen Effekt nach Applikation von ^{131}I nachweisen [244]; [243]. Zusätzlich konnte *Spitzweg et al.* auch in medullären Schilddrüsenkarzinom Xenotransplantaten nach *in vivo* Gentransfer einen therapeutischen Effekt von ^{131}I belegen [250].

Dwyer et al. ist es unter Verwendung des Promoters für MUC1, einem Glykoprotein das in Mamma-, Pankreas-, Ovarial- und Prostatakarzinomen exprimiert wird gelungen, NIS gezielt in Mamma-, Pankreas- und Ovarialxenotransplantattumoren zu exprimieren und dadurch in allen drei Tumormodellen eine Volumenreduktion nach Radioiodapplikation zu erzielen [245]; [248]; [249].

Willhauck et al. untersuchten in murinen und humanen Leberkarzinomzellen den alternativen therapeutischen Ansatz einer Radioiodtherapie nach gewebespezifischem NIS Gentransfer mit Hilfe des tumorspezifischen α -Fetoprotein-Promoters (AFP). Sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* im Xenotransplantatmodell konnte eine tumorspezifische Iodakkumulation erzielt werden. Nach Applikation von 500 μCi (18,5 MBq) ^{123}I akkumulierten die Xenotransplantate eine Radionukliddosis von 15 % ID/g Tumorgewebe, was mittels γ -Kamera detektiert werden konnte. In weiteren Versuchen konnte nach Applikation einer therapeutischen Dosis von 1,5 mCi (55,5 MBq) ^{131}I das Tumorwachstum im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant gehemmt werden [238]. *Klutze et al.* konnten nach NIS Gentransfer mittels eines replikationsinkompetenten Adenovirus und therapeutischer Gabe von ^{131}I eine signifikante Tumorreduktion in humanen Leberkarzinomzellen erzielen [251]. In weiterführenden Untersuchungen hat *Grünwald et al.* aus der eigenen Arbeitsgruppe die Virotherapie mittels onkolytischer Viren untersucht. Onkolytische Viren sind eine Gruppe von Viren die präferenziell Tumorzellen infizieren und töten. Die Idee solche Viren als antitumorale Therapie zu nutzen beruht auf der Beobachtung der Tumorregression nach erfolgter Virusinfektion. Zu der Gruppe der onkolytischen Viren gehören neben dem Adenovirus auch das Herpes Simplex Virus, das Vaccinia Virus, das Reovirus und das Masernvirus [252]. *Grünwald et al.* ist es durch eine einzige intratumorale Injektion eines replikationsselektiven und zur NIS Expression genetisch modifizierten Adenovirus gelungen, eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums von Leberkarzinomen zu erzielen. Die Kombination dieser onkolytischen Virotherapie und einer Radioiodtherapie potentierte den zytotoxischen Effekt und zeigte eine zusätzliche Reduktion des Tumorwachstums und Erhöhung des Überlebens im Vergleich zur alleinigen Virotherapie [242].

1.3.7 Exogene NIS Expression mittels systemischem Gentransfer

1.3.7.1 Viren als Gentransfervehikel

Nach einer erfolgreichen intratumoralen Applikation viraler Vektoren, insbesondere Adenoviren, für den lokalen NIS Gentransfer, wie bereits mehrere Arbeitsgruppen zeigen konnten [235]; [237]; [251]; [230], ist ein wesentlicher Schritt zur Anwendung der NIS Gentherapie auch bei metastasierten Tumoren die Etablierung systemischer Applikationsmöglichkeiten. *Goel et al.* haben zu diesem Zweck ein NIS exprimierendes onkolytisches vesikuläres Stomatitis Virus generiert und in einem Multiplen Myelom Tumormodell über die Schwanzvene systemisch appliziert. Mittels nicht invasivem Gammakamera Imaging konnte nach Applikation von ^{123}I die intratumorale Ausbreitung des Virus detektiert werden. In *in vivo* Versuchen zeigte sich nach therapeutischer Applikation von ^{131}I ein Stillstand des Tumorwachstums und ein verlängertes Überleben sowohl im subkutanen wie auch im orthotopen Tumormodell [253].

In weiteren Untersuchungen haben *Blechacz et al.* in einem Leberkarzinom Xenotransplantatmodell ein NIS kodierendes onkolytisches Masernvirus systemisch appliziert, um mittels NIS ein exaktes Monitoring der *in vivo* Biodistribution dieser onkolytischen Viren mittels Gammakamera Imaging zu erreichen [254].

1.3.7.2 Polyplexe als Gentransfervehikel

Obwohl virale Vektoren aufgrund ihres hohen Gentransferpotentials [255]; [256] die meistgenutzten Gentransfersysteme sind, sind die Induktion immunologischer oder inflammatorischer Prozesse [257], die Elimination durch Antikörper [258], die begrenzte Größe der zu transportierenden Gene, die potentielle Toxizität, wie auch hohe Produktionskosten, die limitierenden Faktoren dieser Gentransfermethode und erfordern die Entwicklung und Charakterisierung alternativer Transportsysteme [255].

Synthetische nicht-virale Vektoren stellen eine attraktive Alternative dar und bestehen aus polykationischen Molekülen, welche benutzt werden um DNA in Submikrometerpartikel zu kondensieren. Sogenannte Polyplexe können effizient in Zellen internalisiert werden, während die DNA von Nukleasen geschützt wird. Vorteile einiger Polyplexe wie z.B. Polyethylenimine (PEI) ist, dass sie über Mechanismen verfügen, welche die Transition der Polyplexe vom Endosom ins Zytoplasma erlauben. Weitere Vorteile sind einfache Synthese und fehlende Immunogenität [255].

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Effektivität einer neuen Klasse von polymerischen Vektoren, basierend auf pseudodendritischen Oligoaminen mit einer hohen intrinsischen Tumoraaffinität (G2-HD-OEI) als nicht virale Gentransfervehikel für den systemischen NIS Gentransfer in einem syngenem murinen Neuroblastom Mausmodell untersucht [255].

In vitro zeigte sich eine 51-fach gesteigerte ^{125}I Akkumulation in Neuroblastomzellen nach vorangegangener Transfektion mit G2-HD-OEI/NIS im Vergleich zu Kontrollzellen. Nach systemischer Applikation der NIS-konjugierten Polyplexe *in vivo* über die Schwanzvene, zeigten im γ -Kamera Imaging 85 % der subkutanen Neuroblastomtumore eine tumorspezifische Iodakkumulation von 8 – 13 % ID/g mit einer biologischen Halbwertszeit von 13 h, womit eine tumorabsorbierte Dosis von 247 mGy/MBq ^{131}I berechnet wurde. Nicht-Zielorgane wie Leber, Lunge, Nieren und Milz zeigten keine relevante Iodaufnahme. Die in diesem Modell beobachtete Tumorspezifität basiert vor allem auf dem „enhanced permeability and retention effect (EPR)“ aufgrund der erhöht durchlässigen Tumorgefäße, kombiniert mit einer inadäquaten lymphatischen Drainage [255]; [259]. Darüber hinaus zeigte sich nach zweimaliger systemischer Applikation der NIS-Polyplexe, gefolgt von einer therapeutischen Applikation von 1,5 mCi (55,5 MBq) ^{131}I eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums [255].

In weiterführenden Studien nutzten *Grünwald et al.* in der eigenen Arbeitsgruppe einen adenoviralen Vektor mit Oberflächenmodifikation durch Polymere um die Effektivität des tumorselektiven systemischen NIS Gentransfers zu steigern und die damit verbundene Option der Viroradiotherapie unter Schonung gesunder Gewebe zu nutzen. Zu diesem Zweck wurde initial ein replikationsinkompetentes Adenovirus, welches das NIS Gen unter Steuerung des unspezifischen CMV Promoters exprimiert, mit poly(amidoamine) Dendrimeren der 5. Generation (PAMAM-G5) umhüllt und die Iodakkumulation *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Dendrimerummantelung führte zu einer signifikant niedrigeren hepatischen Akkumulation von ^{123}I mit dadurch reduzierter Lebertoxizität, bei gleichzeitig signifikant höherer Iodakkumulation in den tumoralen Xenotransplantaten. In parallel durchgeführten Experimenten mit einem replikationsselektiven Adenovirus unter Steuerung des AFP Promotors wurde ebenfalls gezeigt, dass durch die PAMAM-G5 Dendrimerummantelung, im Vergleich zu einer fehlender Ummantelung das Virus effektiver in den Tumor gelangt und das Tumorwachstum signifikant verzögert. Dieser Effekt ist mit einer Überlebensverlängerung der therapierten Mäuse assoziiert. Darüber hinaus, zeigte bereits eine einzige Applikation einer therapeutischen Dosis von ^{131}I eine weitere Stimulation des therapeutischen Effekts [258]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Kombination aus einer adenoviral vermittelten

onkolytischen Virotherapie und einer NIS vermittelten Radiotherapie besonders attraktiv ist, da replizierende Adenoviren zusätzlich zum onkolytischen Effekt einen radiosensibilisierenden Effekt aufweisen [260]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass ionisierende Strahlung ein empfängliches Umfeld für eine adenovirale Transduktion und Replikation erzeugt [261]; [262].

Um eine weitere Optimierung des adenoviralen Gentransfers zu erreichen wurde in weiterführenden Untersuchungen ein NIS tragendes replikationsselektives Adenovirus mittels kationischer poly(amidoamine) PAMAM Dendrimere umhüllt, mit zusätzlicher Kopplung eines epidermal growth factor receptor (EGFR) spezifischen synthetischen Liganden (GE11). Diese Oberflächenmodifikation führte zu einem reduzierten Leberpooling nach systemischer Applikation, was in einer reduzierten Lebertoxizität resultierte. Außerdem zeigte sich ein deutlich verbesserter therapeutischer Effekt nach ^{131}I Applikation, welcher in einem verzögerten Tumorwachstum und verlängerter Überlebenszeit resultierte [263]. Epidermal growth factor receptor (EGFR) wird in einer Reihe epithelialer Tumore, wie Lebertumore hochreguliert und bietet eine ideales Target für eine selektive Tumorthherapie mittels receptorspezifischer Liganden [241]. Epidermal growth factor (EGF) ist der natürliche Ligand der EGFR, führt jedoch durch Tyrosinkinase-Aktivierung mittels einer folgenden Phosphorylierungskaskade zur Förderung des Tumorwachstums. Der synthetische EGFR Ligand GE11 zeigt zwar eine hohe Affinität zum Rezeptor, ohne jedoch eine Aktivierung der Tyrosinkinase hervorzurufen und eignet sich somit als optimaler tumorspezifischer Ligand. Bereits Klutz *et al.* in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Spitzweg, hatten in Vorarbeiten das Potential dieses ligandenspezifischen Targetings unter Verwendung von pegylierten linearen Polyethylenimin (LPEI) Polymeren gezeigt und mittels ^{123}I Szintigraphie und *ex vivo* γ -counting eine NIS spezifische Akkumulation in Lebertumoren nachgewiesen. Auch der zytoreduktive Effekt konnte nach ^{131}I Applikation aufgrund einer signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums bestätigt werden [241].

Ein weiterer Rezeptor, der auf der Oberfläche von vielen Tumorzellen exprimiert wird und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, ist die Rezeptortyrosinkinase cMET/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) und eignet sich somit als weiteres ideales tumorspezifisches Angriffsziel. Basierend auf den oben genannten Vorarbeiten konnten Urnauer *et al.* in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Spitzweg mittels Polyplex-basiertem NIS Gentransfer sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* eine tumorspezifische Iodakkumulation erreichen, die nach therapeutischer Applikation von ^{131}I eine signifikante Wachstumshemmung der Tumore erzielte [264].

1.3.8 NIS und seine Bedeutung als theranostisches Gen

Die oben beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass ein optimierter systemischer NIS-Gentransfer, die Radioiodakkumulation in extrathyreoidalen Tumoren gezielt verbessern kann und zeigt damit das enorme Potential des NIS Gens als diagnostisches und therapeutisches Werkzeug. NIS erfüllt in diesem Kontext seine Doppelfunktion und bringt folgende Vorteile mit sich [191]:

- Das NIS Protein ist ein normales, nicht toxisches, nicht immunogenes Protein [191].
- Die Doppelfunktion von NIS als diagnostisches und therapeutisches Gen erlaubt, direktes, nicht invasives Imaging funktioneller NIS-Expression im Zielgewebe mittels diagnostischer ^{99m}Tc -Pertechnetat, ^{123}I -Szintigraphie, ^{123}I -SPECT bzw. ^{124}I -PET Imaging sowie genaue dosimetrische Berechnungen vor therapeutischer Applikation von ^{131}I [191].
- NIS Gentransfer ist aufgrund des „Crossfire-Effektes“ des β -Strahlers ^{131}I mit einer therapeutischen Reichweite von bis zu 2,4 mm mit einem signifikantem „Bystander Effekt“ assoziiert, d.h. nicht nur NIS exprimierende Zellen, sondern auch NIS negative benachbarte Zellen werden durch die Reichweite der β -Strahlen zerstört [191].
- Eine zweite Art von Bystander Effekt erfolgt durch die Konversion der bestrahlungsbedingten physikalischen Schädigung in ein chemisches Signal durch die exponierten Zellen. Dieser als bestrahlungsinduzierter, biologischer Bystander Effekt (radiation induced biological bystander effect, RIBBE) bezeichnete Effekt, könnte chromosomale Abberationen, genomische Instabilität und Zelltod in nicht direkt im β -Strahlungsgebiet befindlichen Zellen auslösen [194].
- NIS Gentransfer erlaubt die Durchführung der Radioiodtherapie, die schon ein zugelassenes und sicheres Therapieverfahren mit nur geringem Nebenwirkungspotential darstellt und seit über 60 Jahren mit großem Erfolg und viel Erfahrung bei der Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome eingesetzt wird [191].

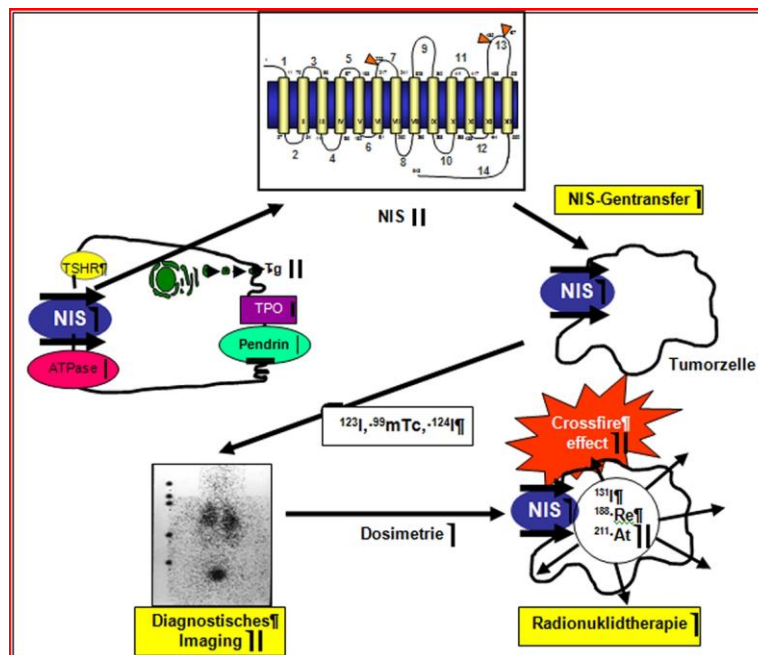


Abb. 3: Die Rolle des NIS-Gens als theranostisches Gen, aus [191].

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der Natrium-Iodid Symporter, der die aktive Iodid-Aufnahme in die Schilddrüse vermittelt, bildet die Grundlage der diagnostischen wie auch therapeutischen Anwendung von Radioiod beim Schilddrüsenkarzinom. Die Klonierung und Charakterisierung des NIS Gens ermöglicht daher die Anwendung von NIS als Reporter- wie auch Therapiegen im Rahmen eines innovativen antitumoralen Gentherapiekonzeptes, basierend auf der NIS-vermittelten Radioiodtherapie nach tumorspezifischem NIS Gentransfer [195]. Die bisherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten eindrücklich zeigen, dass lokaler, selektiver NIS Gentransfer die tumorale Akkumulation einer therapeutisch wirksamen ^{131}I Dosis erlaubt und damit eine potentiell kurative Therapiemöglichkeit bei nicht thyreoidalen Tumoren bieten kann [191]; [232]; [233]; [235]; [265]; [238]; [251]. Mit dem Ziel des systemischen Gentransfers zur Behandlung von metastasierten Tumoren, stellen mesenchymale Stammzellen (MSC) aufgrund ihres intrinsischen Tumor-Homings ideale Gentransfervehikel dar. Auch ihre weiteren Eigenschaften, wie Möglichkeiten zur systemischen wie auch lokalen Applikation, einfache Isolierung und Expansion, einfache genetische Modifikation, sowie Hypoimmunogenität, tragen zu ihrem großen Potential als Gentransfervehikel für antitumorale Gentherapieansätze bei [266]; [8].

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit, in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Nelson (Medizinische Klinik IV, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, LMU München), in Vorbereitung auf eine mögliche zukünftige klinische Anwendung des NIS-Gentherapie-Konzeptes immortalisierte murine und humane MSC Zelllinien etabliert und charakterisiert werden, die nach stabiler Transfektion, NIS unter der Steuerung des gewebeunspezifischen CMV- Promoters exprimieren. In den stabil mit NIS transfizierten MSC Zelllinien erfolgte der molekularbiologische Nachweis funktioneller NIS Expression mittels qPCR auf RNA Ebene sowie mittels Western Blot Analyse auf Proteinebene. Zusätzlich zum Nachweis der Funktionalität, erfolgten Ioduptake- und Iodefflux Assays. Der therapeutische Effekt von ^{131}I wurde *in vitro* mittels Clonogenic Assay in stabil mit NIS transfizierten MSC Monokulturen sowie auch in Kokulturen mit Leberkarzinomzellen (HepG2) untersucht. Zielsetzung dieser Arbeit war es, MSC Zelllinien zu etablieren und zu charakterisieren, als Voraussetzung für deren Anwendung für den *in vivo* NIS Gentransfer in verschiedenen Tumormodellen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Alle Versuche wurden im Labor von Frau Prof. Dr. med. Spitzweg in der Medizinischen Klinik IV (ehemals bis 03/2016 Medizinische Klinik II vor Med II/Med IV Crossover) des Klinikums Großhadern durchgeführt. Bezugsquellen sind in Klammern angegeben.

Die in dieser Dissertation verwendeten Methoden wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Spitzweg etabliert und bereits von Fr. Anne-Liese Kessel und Fr. Christiane Leistner beschrieben.

Das CMV-NIS-pcDNA3 Expressionsplasmid, dass für alle im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet wurde, wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. M. Jhiang, Ohio State University, Columbus, OH.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA

Vektor DNA wurde nach dem Subcloning EfficiencyTM DH5aTM Competent Cells-Protokoll (Thermo Fischer Scientific) im Rahmen einer Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien (Thermo Fischer Scientific) transferiert und vermehrt. Es wurden 5 ng verdünnte Plasmid DNA und jeweils 50 µl Bakterien in einem vorgekühlten Propylen-Reagenzröhrchen gemischt. Im Anschluss daran folgte initial eine 30-minütige Inkubation auf Eis und ein Hitzeschock für 20 Sekunden bei 42°C. Nach einer Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden 950 µl SOC-Medium (Thermo Fischer Scientific) zu den Bakterien gegeben und diese für 1 Stunde bei 225 U und 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:50, 1:100) auf LB/Ampicillin Platten ausplattiert, welche dann bei 37°C über Nacht inkubiert wurden.

2.1.2 DNA-Minipräparation zur Isolierung von Plasmid DNA

Die Minipräparation wurden unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep-Kits (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Initial wurde eine mit dem gewünschten

Plasmid transformierte und über Nacht gewachsene Bakterienkolonie in 6 ml LB-Medium und 6 µl Ampicillin gelöst und für 8 h bei 225 U und 37°C geschüttelt. Danach wurden 2 ml der Bakteriensuspension bei 8000 U für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl oder Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 250 µl oder P2 Puffer (Qiagen) und vorsichtigem Mischen wurden 350 µl P3 Puffer (Qiagen) hinzugefügt und erneut gemischt. Es erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13000 U, in welcher die in den vorherigen Schritten lysierten Bakterien abgetrennt wurden. Im Anschluss wurde der, die DNA enthaltene Überstand, in eine bereitgestellte QIA-Prep-Säule (Qiagen) transferiert. Nach 60 Sekunden Trockenzentrifugation wurde die Säule noch zweimal für je 1 Minute zentrifugiert, zuerst nach Zugabe von 500 µl PB-Puffer (Qiagen) und danach nach Zugabe von 750 µl PE-Puffer (Qiagen). Diese Schritte erfolgten um die Plasmid-DNA von Endonukleasen und Salzen zu reinigen. Einer erneuten Trockenzentrifugation für eine Minute folgte die Überführung der Säule in ein neues steriles Reaktionsgefäß und der Zusatz von 50 µl EB-Puffer (Qiagen). Nach einer Minute Inkubationszeit, in welcher die Plasmid-DNA durch den Puffer aus dem Filter herausgelöst wurde, erfolgte eine einminütige Abzentrifugation. Nach der nachgewiesenen erfolgreichen Transformation wurde das Plasmid in einer DNA-Maxipräparation in größerer Menge isoliert.

2.1.3 DNA-Maxipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA

Für die DNA-Maxipräparationen wurde des Endofree Plasmid Maxi-Kits (Qiagen) verwendet. Initial wurden 250 µl der bereits für die Minipräparation verwendeten Bakteriensuspension unter Zugabe von 250 µl Ampicillin in 250 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 300 U/min geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension bei 4°C und 6000 g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das geerntete bakterielle Pellet in 10 ml P1-Puffer (Qiagen) unter Zusatz von 10 µl RNase A (Qiagen) resuspendiert. Im Anschluss, wurden 10 ml P2-Puffer (Qiagen) hinzugegeben und es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 10 ml eiskalter P3-Puffer (Qiagen) zu der Suspension gegeben, sofort vorsichtig gemischt und das Lysat auf den QIAFilter gegossen, um danach für 10 Minuten in Raumtemperatur inkubiert zu werden. Im Anschluss wurde durch Hilfe des Kolbens das Lysat gefiltert und in einem 50 ml Röhrchen aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 2,5 ml ER Puffer und nach erneutem Mischen wurde das Reaktionsgefäß für 30 Minuten auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit erfolgte die Äquilibration einer Qiagen Tip 500 Säule (Qiagen) mit 10 ml QBT-Puffer (Qiagen), um im

Anschluss den durch die Filtration erhaltenen Überstand über die Säule zu filtern. Im Folgenden wurde die Säule zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (Qiagen) gewaschen, um die Verunreinigungen der Plasmid DNA zu entfernen. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 15 ml des Elutions-Puffers QN (Qiagen) herausgewaschen und durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (Merck) bei Raumtemperatur präzipitiert. Es erfolgte das sofortige Mischen und die Zentrifugation des Präzipitats für 30 Minuten bei 15000 g und 4°C. Nach dem Waschen des Pellets mit 5 ml 70 %igem RNase freiem Ethanol, erfolgte eine erneute 10-minütige Zentrifugation (4°C, 15000 g). Die erhaltene isolierte DNA wurde nach Verwerfen des Überstandes für ca. 10 Minuten unter dem Abzug getrocknet und in ca. 150 µl endotoxinfreiem TE Puffer aufgenommen.

2.1.4 RNA Isolierung

Die RNA aus dem mit dem NIS-Expressionsvektor stabil transfizierten Zellen p53NIS und L87NIS sowie der Wildtypzellen wurde mit Hilfe des Rneasy Kits (Qiagen) gewonnen. Die Zellen wurden in 100 mm-Petrischalen ($1,8 \times 10^6$ Zellen/Schale) ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 90 % wie unter 2.2.2 beschrieben, abtrypsinisiert. Danach erfolgte die Abzentrifugation des Zelllysats und das entstandene Pellet wurde mit 600 µl RLT-Puffer (Qiagen) gründlich resuspendiert. Im Folgenden wurden erst 600 µl 70 % Ethanol (Merck) hinzugefügt und dann gründlich gemixt. Im Anschluss wurden mindestens 700 µl der Suspension auf eine Rneasy Minisäule (Qiagen) übertragen und für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer (Qiagen) auf die Säule wurde eine erneute Zentrifugation durchgeführt. Bei beiden Zentrifugationen wurde der Überstand verworfen. Danach wurde die Säule zwei Mal mit 500 µl RPE-Puffer (Qiagen) für 15 Sekunden bei 10000 U/min gewaschen. Zum Schluss wurde nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Säulenmembran und einer letzten einminütigen Zentrifugation die RNA eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.5 Konzentrationsbestimmung durch Photometrie

Die RNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde mit einem Spektralphotometer über die UV-Absorption der Ribonukleinsäuren bestimmt. Die Extinktion von 500 µl Lösung wurde in einer Quarzküvette über einen Bereich der Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Die Verdünnung der RNA Lösung wurde dabei so gewählt, dass die Werte im

Bereich der größten Messgenauigkeit lagen (1:200). Anhand des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen konnte der Reinheitsgrad der RNA in Bezug auf Proteinverunreinigungen gemessen werden. Der E260/280 Wert sollte bei reiner RNA um die 1,7 liegen. Die Konzentration der Lösung ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde im Folgenden nach der Formel (Verdünnung x RNA-Faktor x Wert der 260 nm-Messung) / Küvettenvolumen berechnet, wobei der RNA-Faktor einem Wert von 40 entspricht.

2.1.6 cDNA Herstellung

Für die PCR wurde Einzelstrang-oligo (dT) Primer cDNA mittels der Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fischer Scientific) generiert. Als erster Schritt wurden 5 μg RNA zusammen mit 10 mM dNTPs, 2 μl eines Random Hexamer Mixes gemischt und mit Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 28 μl aufgefüllt. Danach erfolgte eine erste Inkubation auf 65°C für 5 Minuten und danach eine weitere Minute auf Eis. Im Anschluss wurde der Mix 2, bestehend aus 2 μl RT Puffer, 4 μl MgCl_2 , 2 μl DTT und 1 μl RNase OUT (Thermo Fischer Scientific) bis zu einem Gesamtvolumen von 37 μl hinzupipettiert. Nach sanftem Mischen mit dem Mix aus dem ersten Schritt, erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Minuten bei 25°C. Nach Zugabe von 1 μl Superscript III RT erfolgte der Reverse Transcriptase Lauf wie folgt: Initial wurden für 10 Minuten bei 25°C die Primer angelagert. Im Anschluß erfolgte die Synthese der cDNA für 50 Minuten bei 42°C und danach wurde die Reverse Transcriptase für 15 Minuten bei 70°C inaktiviert. Zum Schluss erfolgte nach dem Hinzugeben von 1 μl RNase H (Thermo Fischer Scientific) die letzte Inkubation für 20 Minuten bei 37°C um verbliebene RNA Stränge abzubauen. Die cDNA Produkte konnten einige Stunden bei 4°C oder langfristig bei -20°C gelagert werden.

2.1.7 mRNA Nachweis mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Für die qPCR wurde Einzelstrang-oligo (dT) Primer cDNA wie unter Abschnitt 2.1.6 beschrieben hergestellt. Als Primer für die qPCR wurden folgende Sequenzen benutzt: hNIS: (5'-TGCGGGACTTTGCAGTACATT-3') und (5'-TGCAGATAATTCCGGTGGACA-3') und als interne Kontrolle GAPDH: (5' -GAGAAGGCTGGGGCTCATTT-3') und (5'-CAGTGGGGACACGGAAGG-3'). Die quantitative real-time PCR (qPCR) wurde mittels des SYBR green PCR Master Mix (Qiagen) in der Rotor Gene 6000 (Corbett Research)

durchgeführt. Pro Probe wurden 5 µl cDNA, 12,5 µl SYBR green Mix, jeweils 1 µl Primer und 5,5 µl H₂O zu einem Gesamtvolumen von 25 µl pipetiert. Zur quantitativen Auswertung erfolgte die Erstellung einer Standardkurve für unterschiedliche NIS DNA Konzentrationen zwischen 1 µg und 0,00001 fg. Der PCR Lauf erfolgte unter den folgenden Bedingungen: Initial wurden die Proben für 2 Minuten bei 50°C und für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach erfolgten 40 Zyklen bestehend aus einer 15-sekündigen Denaturierung bei 95°C, einer 15-sekündigen Anlagerung der Primer bei 55°C und einer 15-sekündigen Elongation bei 72°C. Der hier benutzte SYBR green Farbstoff produziert ein Fluoreszenzsignal, welches die Menge des PCR Produktes reflektiert. Die relativen Expressionslevels wurden mittels komparativer $\Delta\Delta C_t$ Methode und internaler GAPDH für die Normalisierung berechnet.

2.2 Zellkultur und Zelllinien

2.2.1 Verwendete Zelllinien

Bei den in dieser *in vitro* Versuchsreihe verwendeten Zellen handelte es sich um die aus dem Knochenmark von p53 knock-out C57/B16 Mäusen isolierte mesenchymale Stammzelllinie p53 und die aus humanem Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzelllinie L87. Beide Stammzelllinien wurden durch SV40 lange T Antigen immortalisiert (*Thalmeier und Huss 2001*) [267] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Nelson, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Med. Poliklinik IV, LMU München.

Für den *in vitro* Clonogenic Assay von Mischkulturen wurden zusätzlich humane hepatozelluläre Karzinomzellen HCC (HepG2) verwendet.

2.2.2 Medium und Zellkulturbedingungen

Alle Zellkultur-Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung von sterilen Materialien, Geräten, Lösungen und Medien. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und unter Anreicherung der Luft mit 5 % CO₂ kultiviert.

Die p53 und L87 Wildtyp Zellen wurden in 100 mm Petrischalen mit 10 ml Medium bei 70 % - 80 %iger Konfluenz kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) supplementiert mit 10 %igem fetalem Kälberserum (Biochrom) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Dem Medium der stabil

transfizierten Klone p53NIS und L87NIS wurde noch das Selektivantibiotikum Geneticin (Thermo Fischer Scientific) in einer Konzentration von 200 µg/ml im Fall der p53 Zelllinie und 500 µg/ml für die L87 Zelllinie supplementiert. Die HepG2 Zellen wurden in 100 mm Petrischalen mit 10 ml Medium bei 70 %iger Konfluenz kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) supplementiert mit 10 %igem fetalem Kälberserum (Biochrom) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Das Medium wurde jeden 2 - 3 Tag gewechselt oder die Zellen bei mehr als 80 % Konfluenz wie folgt passagiert.

Als Erstes wurde zuerst das Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 5 ml hinzugefügtem 1 x PBS-Puffer durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken der Petrischale gewaschen. Danach wurde der Puffer wieder abgesaugt, die Zellen mit 1 - 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA (Thermo Fischer Scientific) benetzt und für 20 Sekunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die vollständig vom Untergrund gelösten Zellen vom Schalenboden abgewaschen und in 10 ml RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) Medium- supplementiert mit 10 %igem fetalem Kälberserum (Biochrom) und 1 %igem Penicillin/Streptomycin, bzw. zusätzlich Geneticin in einem Propylenröhrchen aufgenommen. Nachdem durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine gleichmäßige Zellsuspension erhalten worden war, wurden die gelösten Zellen entweder auf neue Petrischalen verteilt oder für die verschiedenen Experimente in 6-Well Platten mit der erforderlichen Zellzahl unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer (Brand) ausgesät.

2.2.3 Kryokonservierung

Rückzufrierende Zellen der jeweiligen Passagen wurden ebenfalls zuerst mit 5 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen und danach mit 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA (Thermo Fischer Scientific) für 20 Sekunden im Brutschrank inkubiert. Nach Abwaschen der Zellen vom Schalenboden, erfolgte die Zentrifugation der Suspension über 5 Minuten bei 1200 U. Das entstandene Pellet wurde dann im Einfriermedium, bestehend aus 95 %igem fetalem Kälberserum und 5 %igem DMSO (Sigma), resuspendiert und im Anschluss an eine Zwischenlagerung über 24 Stunden bei -80 °C im Isopropanol-Behälter, im Stickstofftank bei -180 °C aufbewahrt.

2.2.4 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen MTS-Assay (Sigma) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Am Tag vor dem Versuch wurden die p53 Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well und die L87 Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Ohne Absaugen des Mediums wurde in jedes Well 200 µl des frisch hergestellten MTS (3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)/ PMS (phenazine methosulfate solution)-Reagenz-Gemisches hinzupipettiert und die Zellen bei 37°C für 1,5 Stunden inkubiert. Die Absorption des entstandenen Formazan-Produkts wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt, die direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist.

2.2.5 Transfektion

2.2.5.1 Geneticin als selektives Antibiotikum

Das für die im Folgenden beschriebenen Transfektionen benutzte CMV-NIS-pcDNA3 Expressionsplasmid enthielt bereits ein Geneticin-Resistenzgen zur Selektion der erfolgreich mit diesem Plasmid transfizierten Zellen. Das Selektionantibiotikum Geneticin (Thermo Fischer Scientific) wurde in einer Konzentration von 200 µg/ml für die p53 Zellen und 500 µg/ml für die L87 Zellen eingesetzt. Die benötigte Geneticin-Konzentration, die zu einer Absterberate von $> 75\%$ der Wildtyp-Zellen führte, war zuvor durch einen Proliferationsassay ermittelt worden.

2.2.5.2 Transiente Transfektion der immortalisierten murinen MSC

Einen Tag vor der Transfektion wurden die verwendeten p53 Zellen nach dem unter dem Abschnitt 2.2.2 erläuterten Protokoll trypsinisiert und mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät, um am nächsten Tag eine 50 – 60 %ige Zellkonfluenz zu erreichen. Daraufhin wurden die Zellen mittels LipofectAMINE Plus Reagent (Thermo Fischer Scientific) mit dem NIS-pcDNA3 Vektor transfiziert. Der Versuchsansatz wurde im Medium RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific) ohne Serum- oder Antibiotikazusatz und nach den genauen Empfehlungen der Hersteller durchgeführt, wobei verschiedene Verhältnisse von eingesetzter DNA-Menge und dem verwendeten Transfektionsreagenz

ausgetestet wurden. Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung erfolgt in Abschnitt 2.2.5.4. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Iod-Uptake Assay (siehe 2.3.1) auf den Transfektionserfolg untersucht, und die Versuchsbedingungen mit der höchsten erzielten Iod-Aufnahme für die stabile Transfektion ausgewählt.

2.2.5.3 Transiente Transfektion der immortalisierten humanen MSC

Die transiente Transfektion der L87 Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben. Die L87 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät um am nächsten Tag eine 50 - 60 %ige Konfluenz zu erreichen.

2.2.5.4 Stabile Transfektion der immortalisierten murinen MSC

Die p53 Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der stabilen Transfektion wie bereits unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben ausgesät.

Bei der Verwendung von LipofectAMINE Plus (Thermo Fischer Scientific) wurden 1 µg des oben angegebenen NIS-pcDNA3 Plasmids vorsichtig mit 6 µl Plus Reagenz (Thermo Fischer Scientific), einem die Komplexbildung anregendem Enhancer, sowie 25 µl reinem Medium (d. h. ohne Serum- oder Antibiotikazusatz) gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 µl LipofectAMINE in weiteren 25 µl Medium zugegeben, und das Gemisch für weitere 15 Minuten inkubiert. Vor Verteilung des Reagenzgemisches auf die Zellen, wurde das vorhandene Medium der p53 Zellen abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS-Puffer kurz gewaschen. Im Anschluss wurden 950 µl frisches, (Serum- und antibiotikafreies Medium) vorgelegt und danach 50 µl des Reaktionsgemisches pro Well gleichmäßig auf die Zellen verteilt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Medium- supplementiert mit 20 % fetalem Kälberserum- auf die Zellen gegeben und 24 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der 24-stündigen Inkubation unter Normalbedingungen wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 2 ml Kompletmedium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt und 2 ml Kompletmedium, welches mit 200 µg/ml Geneticin (Thermo Fischer Scientific) als Selektionsantibiotikum supplementiert worden war, ersetzt. Die Überlebenden, d.h. erfolgreich transfizierten Klone wurden nach 2 Wochen, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit, mittels Zylindertechnik isoliert, hochgezogen und einem Screening per Iod-Uptake Assay unterworfen.

2.2.5.5 Stabile Transfektion der immortalisierten humanen MSC

Die stabile Transfektion der L87 Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.5.4 beschrieben. Auch hier wurden 1 µg NIS-pcDNA3 Plasmid, 6 µl Plus Reagenz (Thermo Fischer Scientific) und 4 µl LipofecAMINE benutzt, jedoch wurde hier das Komplettmedium mit 500 µg/ml Geneticin (Thermo Fischer Scientific) als Selektionsantibiotikum supplementiert.

2.3 Iod-Uptake Versuche *in vitro*

2.3.1 Iod-Uptake Assay

Der Iod-Uptake Assay wurde nach der von *Weiss et al.* etablierten Methode durchgeführt [268]. Am Tag vor dem Versuch wurden die Zellen mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Als Erstes wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Inkubationspuffer HBSS (Thermo Fischer Scientific), dass mit 10 µM Natriumiodid (Sigma) und 10 mM HEPES (Sigma) supplementiert und auf einen pH von 7,38 eingestellt worden war kurz gewaschen. Dann wurde zu jedem Well 1 ml Inkubationspuffer, welchem zuvor 0,1 µCi Na^{125}I /ml (Perkin Elmer, Braunschweig) hinzugefügt worden waren, hinzupipettiert. Den Kontroll-Wells wurde zusätzlich 100 µM KCLO_4 (Merck), welches selektiv die NIS-vermittelte Iod-Aufnahme in die Zellen hemmt, zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin für 35 - 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das radioaktiv versetzte HBSS abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem HBSS kurz gewaschen, um das nicht von den Zellen aufgenommene Iod zu entfernen. In einer 20-minütigen Inkubation der Zellen in 1 ml 1 N NaOH (Merck) unter Schütteln bei ca. 300 U wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität im Zell-Lysat im γ -Counter gemessen.

2.3.2 Kinetik der Iodakkumulation

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Iod-Akkumulation in den NIS-transfizierten Zellen wurde eine Kinetik für den Iod-Uptake durchgeführt. Der Versuch entsprach dem unter Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Iod-Uptake Assay, mit dem Unterschied, dass jede 6-Well Platte für eine unterschiedliche Zeitspanne inkubiert wurde (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 oder 90 Minuten). Dann wurde die Reaktion jeweils, wie oben bereits beschrieben, gestoppt, und mit Hilfe des γ -Counters die Radioaktivität bestimmt. Die so ermittelte

Inkubationszeit, die zur höchsten Iod-Akkumulation führte, wurde im Folgenden für alle Iod-Uptake Experimente als optimale Inkubationsdauer verwendet.

2.3.3 Iod-Efflux

Um die Geschwindigkeit, mit welcher die Zellen das zunächst akkumulierte ^{125}I wieder verlieren, genau bestimmen zu können, wurde ein Iod-Efflux-Assay nach der Methode von *Weiss et al.* durchgeführt [268]. Drei Tage zuvor in 6-Well Platten ausgesäte Zellen (1×10^5 Zellen pro Well), wurden wie bereits unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben, für 45 Minuten bei 37°C mit weiter oben beschriebenem Puffer inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium 90 Minuten lang alle 5 Minuten durch frisches HBSS (ohne ^{125}I) ersetzt. Der ^{125}I -Gehalt des jeweiligen Überstandes, der dem Iod-Verlust der Zellen in den vorangegangenen fünf Minuten entsprach, wurde im γ -Counter gemessen. Nach Ablauf der 90 Minuten wurde das noch in den Zellen akkumulierte ^{125}I nach einer 20-minütigen Inkubation der Zellen mit 1 ml 1 N NaOH mittels γ -Counter gemessen.

2.4 Western Blot

2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot-Analyse (Membranpräparation)

Zuvor in 150 mm Petrischalen ausgesäte Zellen wurden nach Verwerfen des Mediums kurz mit eiskaltem 1x PBS-Puffer gewaschen, nach Zugabe von 1 ml Puffer A von dem Boden der Kulturschale abgeschabt und das erhaltene Zelllysate auf Eis gut resuspendiert. Die Lösung wurde daraufhin bei 4°C und 500 g (= 2000 U) für 15 Minuten zentrifugiert und dem erhaltenen Überstand 100 μl $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{ml}$ hinzugegeben, um die darin erhaltenen Proteine zu binden. Nach Inkubation bei 4°C für 45 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln, wurde bei 100000 g (= 25.000 U/min) und 4°C für 20 Minuten ultrazentrifugiert. Das erhaltene Pellet, in welchem sich die Membranproteine befanden, wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes in 200 μl Puffer B gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.2 Protein-Konzentration (Bradford-Proteinbestimmung)

Die Konzentration der Proteinlösung wurde unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad) bestimmt. Als Erstes wurde eine Proteinstandardkurve aus verschiedenen Verdünnungsstufen (0 - 1 mg/ml) einer BSA (bovine serum albumin, Sigma) - Stocklösung unter Zusatz des 1:5 verdünnten Biorad-Konzentrats (Bio-Rad) erstellt. Diese ergab sich aus den OD-Werten der Verdünnungen bei 595 nm nach einer vorausgehenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Anhand dieser Standardkurve erfolgte die Bestimmung der Konzentration der Proteinlösung.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gleiche Konzentrationen an Membranprotein (je nach Versuch 20, 30 oder 40 µg) wurden mit 7,5 µl Sample Puffer (NuPage, Thermo Fischer Scientific), 3 µl Reducing Agent (NuPage Thermo Fischer Scientific) und DNase freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 26 bis 50 µl gemischt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert.

Danach wurden sowohl die Proben, wie auch der verwendete Marker (Precision Plus Protein, All Blue Standarts, Bio-Rad), in die Taschen eines 4 – 12 %igen Bis-Tris-HCl gepufferten Polyacrylamidgels (NuPage, Thermo Fischer Scientific) pipettiert und im Running Puffer bei 200 Volt für eine Stunde laufen gelassen.

2.4.4 Western Blot-Analyse

Im nun folgenden Elektroblothing wurden bei 25 Volt im Transfer Puffer für eine Stunde die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert. Zuerst wurden die Kammern vorsichtig weggestochen und danach wurde das Gel mit Hilfe eines trockenen Filterpapiers von seiner Hülle gelöst und mit Transfer Puffer getränkten Schwämmen und Filterpapieren zu einem Sandwich gestapelt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm, Thermo Fischer Scientific) luftblasenfrei auf die Geloberfläche aufgebracht und das Sandwich in die Transferkammer eingelegt, wobei die kathodennahe Ausrichtung der Membran eingehalten wurde.

Im Anschluss an das Elektroblothing wurde die Membran mit dem Ziel unspezifische Proteine zu blocken für eine Stunde unter Schütteln mit 5 %iger Milch-TBST (Tris buffered saline and tween)-Lösung inkubiert und nach Zugabe eines monoklonalen Maus-Antikörpers in einer 0,1

%igen Milch-TBST Lösung gegen die Aminosäurereste 468-643 des NIS-Proteins (Verdünnung 1:3000) (Milipore) über Nacht bei 4°C im Dunkeln geschüttelt.

Am Folgetag wurde die Membran nach Absaugen des 1. Antikörpers erneut mit TBST gewaschen (1 x für 15 und dann 2 x für je 5 Minuten). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Jackson Immuno Research), einem mit Peroxidase-gelabeltem Antimaus-Antikörper der Ziege (Verdünnung 1:5000, 0,1 %ige Milch-TBST Lösung, 1 Stunde bei Raumtemperatur). Anschließend wurde die Membran für 1 x 15 Minuten und 4 x für je 5 Minuten mit TBST gewaschen, bevor sie für 1 Minute mit dem ECL-Reagenz (Enhanced chemiluminescence Western Blot detection Reagent, Amersham. Braunschweig, Germany) inkubiert und im Verlauf zwischen 1 und 30 Minuten unter Verwendung eines KODAK BIO MAX MR Films (Sigma) exponiert wurden. Anhand des im Gel mitgelaufenen Markers konnte das Molekulargewicht der Banden bestimmt werden, außerdem ließ er eine Abschätzung der Transfer-Effizienz zu.

2.5 *in vitro* Clonogenic Assay

2.5.1 Durchführung Monokulturen

Die mit dem NIS-Expressionsvektor stabil transfizierte Zellen p53NIS und L87NIS bzw. Wildtyp Zellen p53WT und L87WT wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in einer Dichte von 1,5 Millionen Zellen/Flasche ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 60 – 70 % wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 7 Stunden mit 0,8 mCi Na-¹³¹I (GE Health Care) (in HBSS-Inkubationspuffer, der mit 10 µM NaI (Sigma) und 10 mM HEPES (Sigma) supplementiert und auf einem pH von 7,3 eingestellt worden war), im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation mit ¹³¹I wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit 0,05 % Trypsin-EDTA abtrypsiniert und in einer Zelldichte von 25-50-75-100-150-200 Zellen/Well für die alle Zellreihen (p53WT und p53NIS, L87WT und L87NIS) (je sechs Wells pro Konzentration) in 12-Well Platten in regulärem Wachstumsmedium ausgesät.

Parallelexperimente wurden für jede Zelllinie im HBSS-Inkubationspuffer ohne den Zusatz von radioaktivem Iod zur Kontrolle durchgeführt.

2.5.2 Färbung und Auswertung

Nachdem sich nach ca. 1 - 2 Wochen Zellkolonien gebildet hatten, wurden die Zellen mit kaltem 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl eiskaltem (-20°C) 100 % Methanol/Well (Merck) für 10 Minuten im Kühlschrank fixiert. Im Anschluss erfolgte für 5 Minuten eine Färbung mit 1 %igem Kristallviolett (Merck) und die Auszählung der Zellkolonien unter dem Mikroskop. Dabei wurden nur Kolonien ausgezählt, die aus ca. 50 Zellen oder mehr bestanden. Die für jede Zellreihe separat bestimmte Überlebensrate entsprach dem Prozentsatz an Zellkolonien nach ¹³¹I-Behandlung, verglichen mit denen nach Inkubation mit HBSS-Inkubationspuffer.

2.5.3 Durchführung Kokulturen

Die mit dem NIS-Expressionsvektor stabil transfizierten Zellen p53NIS und L87NIS bzw. Wildtyp Zellen p53WT und L87WT wurden in Ko-Kultur mit HCC (HepG2) Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen in einer Dichte von 8 x 10⁵ Zellen/Flasche und einem Zellverhältnis von 1:1 und 1:2 ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 60 – 70 % wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und im Anschluss für 7 Stunden mit 0,8 mCi Na-¹³¹I (GE Health Care) (in HBSS-Inkubationspuffer, der mit 10 µM NaI (Sigma) und 10 mM HEPES (Sigma) supplementiert und auf einem pH von 7,3 eingestellt worden war) im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation mit ¹³¹I wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und initial jeweils nur die Stammzellen p53NIS, L87NIS, p53WT und L87WT mit 1 % Trypsin (Thermo Fischer Scientific) in PBS abtrypsiniert und verworfen. Die HepG2 Zellen wurden in einem zweiten Schritt mit 0,05 % Trypsin/EDTA (Thermo Fischer Scientific) in einer Zelldichte von 25-50-75-100-250 Zellen/Well (je sechs Wells pro Konzentration) in 12-Well Platten in regulärem Wachstumsmedium ausgesät.

Parallelexperimente wurden für jede Zelllinie im HBSS-Inkubationspuffer ohne den Zusatz von radioaktivem Iod zur Kontrolle durchgeführt.

2.5.4 Färbung und Auswertung

Die Färbung und Auswertung des Clonogenic Assays der Kokulturen erfolgte wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben.

2.6 Statistik

Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit kommerzieller Software (Excel). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung der dreifachen Ausführung dargestellt. Die Fehlerbalken in den Tabellen geben die Standardabweichung an. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des t-Tests berechnet.

2.7 Verwendete Geräte

Wasserbäder:	GFL (Labor) Köttermann (Zellkultur)
Schüttler:	IKA Vibrax VXR basic (Western Blot) Edmund Kühler Laborgerätebau (Iod-Uptake) Edmund Kühler (Mini- und Maxiprep)
Mischer:	IKA
Vortexer:	Scientific Industries
Pipetten:	Eppendorf
Pipetus:	Hirschmann Brand Acucheck
Heizblock:	Eppendorf Thermomixer 5463
Zentrifugen:	5415 Eppendorf (Miniprep) S 60 Ultrazentrifuge Beckmann (Membranpräp) Hettich (Zellkultur) RC5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Kendro (Maxiprep) Universal 30 RF Hettich (Maxiprep)
Gelelektrophorese:	BioRad Power Pac 3000 als Stromquelle Invitrogen XCell Sure Lock (Western Blot)
Waagen:	Sartorius
qPCR-System:	Rotor Gene 6000 (Corbett Research)
Mikrowelle:	Siemens
Kühlschränke:	Liebherr
g-Counter:	Berthold
Drucker:	Epson (g-Counter) HP Laserjet 2200dn (Computer)
Computer:	Fujitsu Computers Siemens
Brutschrank:	Hera cell 240, Heraeus (Zellkultur) Heraeus (^{131}I) Heraeus (^{125}I) Gallenkamp (Bakterien)
Geigerzähler:	Berthold

Stickstofftank:	Messer Griesheim
PH-Elektrode:	Hanna Instruments
Spektralphotometer:	Vitrospec plus, CKB Biochrom
UV-Stratallinker:	Stratagene
Mikroskop:	Olympus (Zellkultur)
Neubauer Zählkammer:	Brand

2.8 Verwendete Materialien

Chemikalien

Kristallviolett	Merck
Ethanol	Merck
Methanol	Merck
Isopropanol	Merck
DMSO	Sigma
MTS	Sigma
KClO ₄	Merck
NaOH	Merck
Natriumiodid	Sigma
Ampicillin	Sigma

Antikörper

NIS Antikörper der Maus (1. Antikörper Western Blot) (Milipore)

Antimaus Antikörper der Ziege (2. Antikörper Western Blot) (Jackson Immuno Research)

Primer

NIS Primer qPCR	Eurofins
GAPDH Primer qPCR	Eurofins

Spezielle Materialien

QIAprep Spin Miniprep-Kit	Qiagen
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen

SYBR green PCR master Mix	Qiagen
RNeasy Kit	Thermo Fischer Scientific
Superscript III Reverse Transcriptase	Thermo Fischer Scientific
Inklusive: dNTPs, Random Hexames, RT Puffer, MgCl ₂ , DTT, RNase OUT	
LipofectAMINE	Thermo Fischer Scientific
Plus Reagenz	Thermo Fischer Scientific

Zellkultur

RPMI 1640:	Thermo Fischer Scientific
0,05 % Trypsin/EDTA	Thermo Fischer Scientific
1 % Trypsin	Thermo Fischer Scientific
Penicilin/Streptomycin	Thermo Fischer Scientific
Geneticin	Thermo Fischer Scientific
Fetales Kälberserum	Biochrom

Iod

¹³¹ I	GE Health Care
¹²⁵ I	Perkin Elmar

Western Blot

Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad
Bio-Rad Kontentrat	Bio Rad
Sample Buffer	NuPAGE, Thermo Fischer Scientific
Reducing Agent	NuPAGE, Thermo Fischer Scientific
Western Blot Marker	Precision Plus Potein, All Blue Standarts, Bio-Rad
4 - 12 % Bis-Tris HCL Gel	NuPAGE (Thermo Fischer Scientific)
Filterpapier	Whatman
Nitrocellulosemembran	Thermo Fischer Scientific
ECL Reagenz	Enhanced chemiluminescence Western Blot detection Reagent, Amersham, Braunschweig, Germany
KODAK BIO MAX MR Film	Sigma

Puffer und Medien

HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)	Thermo Fischer Scientific
PBS Puffer für Zellkultur	Thermo Fischer Scientific
1 x PBS Puffer (Phosphate buffered saline):	8 g NaCl 0,2 g KCl 2,16 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
HEPES Puffer	Sigma
LB Medium:	10 g Trypton (Oxoid) 5 g Yeast Extract (Oxoid) 10 g NaCl (trocken) (Merck) Auf 1000 ml mit destilliertem (oder Millipore) Wasser auffüllen
Ampicillin-Agar:	2,5 g Select Agar (Gibco BRL) 150 ml steriles LB Medium 150 µg/ml Ampicillin (Sigma)
Puffer A (Membranpräparation):	42,8 g 250 mM Saccharose (Merck) 1,1915 g 10 mM HEPES (Sigma) auf pH 7,5 einstellen 0,186 g 1 mM EDTA (Gibco) pro 100 ml 2 Complete Tabletten (10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, Roche) auf 500 ml mit Millipore auffüllen
Puffer B (Membranpräparation):	8,56 g 250 mM Saccharose (Merck) 0,2383 g 10 mM HEPES (Sigma) 0,0953 g 1mM MgCl (Merck)

	auf 100 ml mit Millipore auffüllen
MOPS SDS Running Puffer:	40 ml 20 x Running Buffer (NuPage MOPS SDS Running Buffer, Thermo Fischer Scientific) 760 ml destilliertes Wasser
Transfer Puffer:	20 ml 20 x Transfer Buffer (NuPage Transfer Buffer, Thermo Fischer Scientific) 380 ml destilliertes Wasser
TBST:	10 ml 1M Tris pH 7,4 (Roth) 4 g NaCl (Merck) 500 µl Tween-20 (Merck) auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
5 %-Milch-TBST:	1 g Milchpulver (Bio-Rad) 20 ml TBST
0,1 % Milch-TBST:	20 ml TBST 400 µl 5 % Milch

Materialien

Propylene-Röhrchen:	BD Falcon, Frankreich
γ - Counter Röhrchen:	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen:	Costar, Corning, USA (für Pipetus) Eppendorf, Hamburg
x-Well Platten:	BD Falcon, Frankreich
Petrischalen:	BD Falcon, Frankreich
Zellkulturflaschen:	BD Falcon, Frankreich
Küvetten:	Sarstedt

Ultrazentrifugen-Röhrchen:	Beckmann, Palo Alto, USA
Glasgefäße, z.B. Erlmeier:	Schott Duran, Deutschland
Reaktionsgefäße:	Eppendorf, Hamburg BD Falcon, Frankreich

3. ERGEBNISSE

3.1 Selektion der erfolgreich mit NIS transfizierten Zellen durch Messung der Iod-Akkumulation

Initial wurden die oben beschriebenen immortalisierten mesenchymalen Stammzelllinien p53 und L87 mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor mittels LipofectAMINE und Plus Reagenz unter serumfreien Bedingungen transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen 48 h lang im serumhaltigen Nährmedium ohne Antibiotikazusätze inkubiert und die funktionelle NIS Expression mittels Iod-Uptake Assay nach der Methode von *Weiss et al.* [268] bestimmt. Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden die p53 und L87 Wildtypzellen mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor stabil transfiziert.

Alle über die nächsten 2 Wochen im Geneticin-Selektivmedium wachsenden Zellklone wurden isoliert und in einem diagnostischen Iod-Uptake Assay auf ihre Iodid-Aufnahmefähigkeit hin getestet. Die Aufnahmefähigkeit von ^{125}I korrelierte dabei mit der funktionellen NIS Expression auf der Zellmembran. Die im Folgenden als p53NIS und L87NIS bezeichneten Zelllinien, sind die Zelllinien mit der höchsten Iodid-Aufnahme und wurden für alle weiterführenden Experimente verwendet.

^{125}I wurde Perchlorat-abhängig bis zu 30-fach höher in der murinen p53NIS Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie p53WT ohne CMV-NIS-pcDNA3 Transfektion akkumuliert (siehe Abb. 4).

Perchlorat ist wie bereits oben erwähnt ein kompetitiver Inhibitor von NIS. Der Mechanismus der Inhibition des NIS-vermittelten Iodidtransports durch Perchlorat beruht auf der Ähnlichkeit der Größe und Ladung der Anionen mit Iodid [196]. Darüber hinaus ist die Monovalenz der Anionen eine wesentliche Voraussetzung für die Inhibition. Perchlorat wird außerdem nach Aufnahme in die Schilddrüsenfollikelzelle schnell metabolisiert und nicht in der Schilddrüse konzentriert [199].

In der humanen L87NIS Zellreihe zeigte sich eine 60-fach höhere Perchlorat-abhängige Akkumulation von ^{125}I im Vergleich zu der Kontrollzelllinie L87WT ohne CMV-NIS-pcDNA3 Transfektion (siehe Abb. 5).

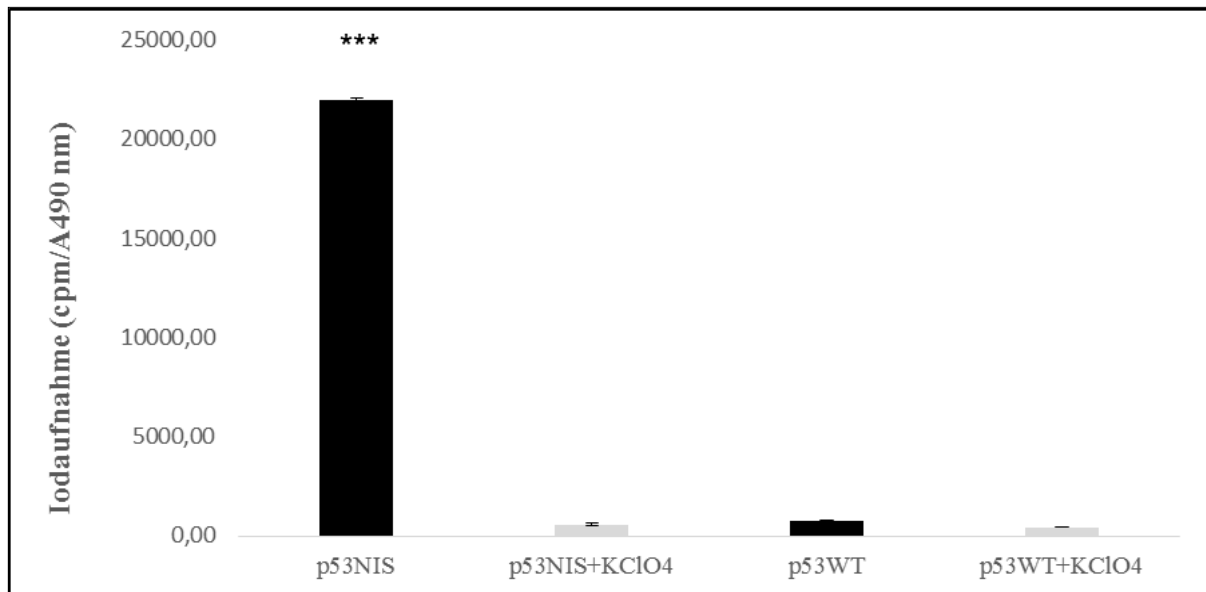


Abb. 4: Iodaufnahme in stabil mit CMV-NIS-pcDNA3 transfizierten murinen MSC (p53NIS) und den Wildtyp MSC (p53WT). Die stabil transfizierte murine Zelllinie p53NIS akkumulierte ^{125}I ca. 30-fach höher ($p < 0,001$) als die Wildtypzelllinie p53WT. Die p53NIS und p53WT Zellen mit zusätzlicher Perchloratinkubation, zeigten ebenfalls keine signifikante Iodaufnahme.

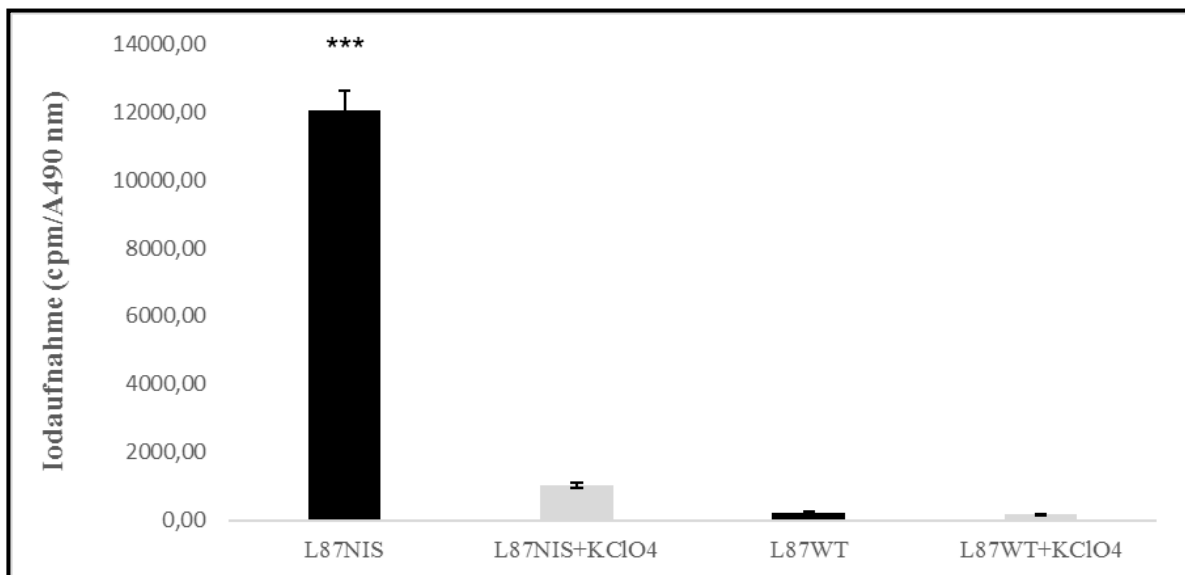


Abb. 5: Iodaufnahme in stabil mit CMV-NIS-pcDNA3 transfizierten humanen MSC (L87NIS) und den Wildtyp MSC (L87WT). Die stabil transfizierte humane Zelllinie L87NIS akkumulierte ^{125}I ca. 60-fach höher ($p < 0,001$) als die Wildtypzelllinie L87WT. Die L87NIS und L87WT Zellen welche mit Perchlorat inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine signifikante Iodaufnahme.

3.2 Charakterisierung des NIS-induzierten Iod-Uptakes

3.2.1 Iodaufnahme-Kinetik

Um den Zeitpunkt der maximalen Iod-Akkumulation in den mit CMV-NIS-pcDNA3-Vektor stabil transfizierten MSC genau zu bestimmen, wurde eine Zeit-Kinetik ermittelt. Diese zeigte eine Absättigung der Iod-Akkumulation in den p53NIS Zellen nach 80 Minuten Inkubationszeit und in den L87NIS Zellen nach 50 Minuten Inkubationszeit (siehe Abb. 6 und 7).

Somit wurden im Folgenden alle weiteren Experimente mit einer konstanten ^{125}Iod -Inkubationszeit von 80 Minuten für die p53NIS Zellen und von 50 Minuten für die L87NIS Zellen durchgeführt.

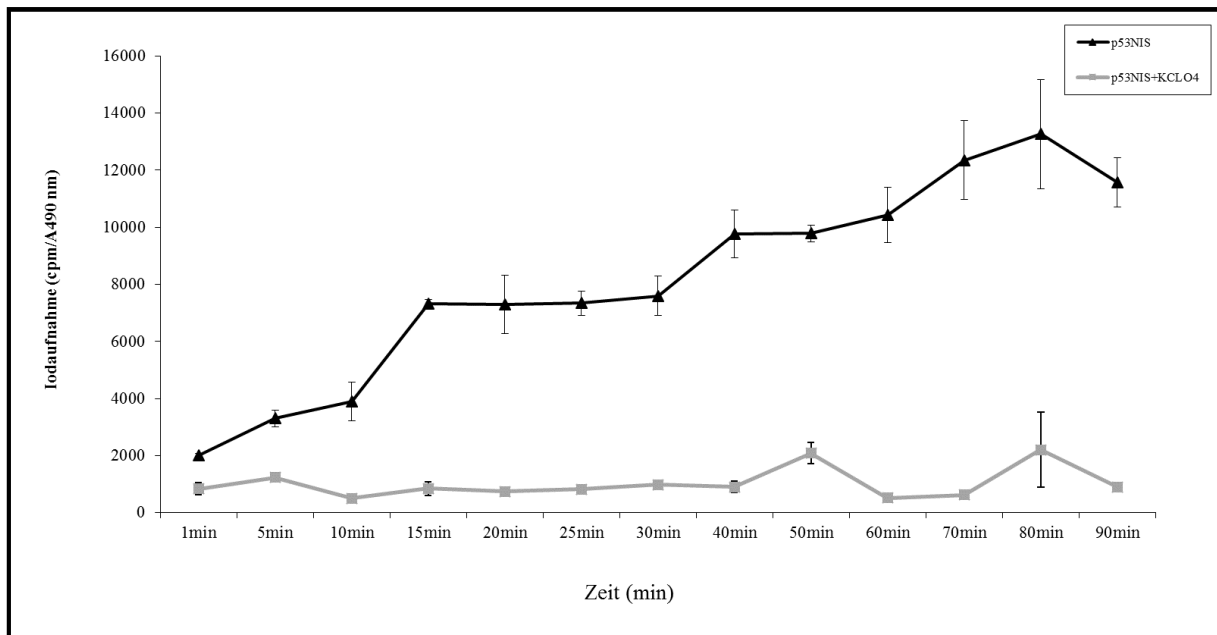


Abb. 6: Zeitabhängige Iodakkumulation in stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten p53NIS Zellen. Halbmaximale Iodakkumulation nach ca. 20 Minuten, maximale Iodakkumulation nach 80 Minuten.

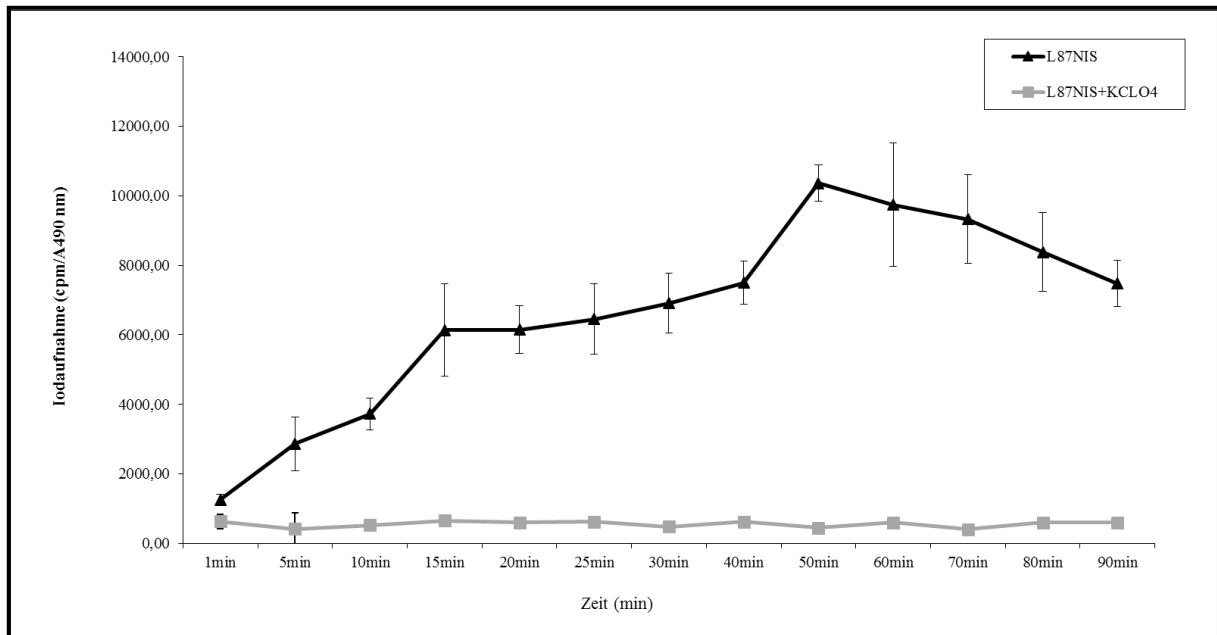


Abb. 7: Zeitabhängige Iodakkumulation in stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten L87NIS Zellen. Halbmaximale Iodakkumulation nach ca. 15 Minuten, maximale Iodakkumulation nach 50 Minuten.

3.2.2 Iod Efflux

Im *in vitro* Iod-Efflux-Assay in den stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten p53NIS Zellen zeigte sich innerhalb der ersten vier Minuten ein sehr rascher Efflux von über 90 % des akkumulierten Iodids, mit jedoch stabilem Verbleib des restlichen Radioiods von ca. 5 % bis 50 Minuten nach initialer Aufnahme. Nach 80 Minuten war das ursprünglich aufgenommene Iodid vollständig eliminiert (siehe Abb. 8).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten L87NIS Zellen. In den ersten 4 Minuten kam es zu einem sehr raschen Efflux von über 90 % des akkumulierten Iods, es zeigte sich jedoch ein stabiler Verbleib des Radioiods von ca. 4 % bis 50 Minuten nach initialer Aufnahme. Nach 70 Minuten war das ursprünglich aufgenommene Iod vollständig eliminiert (siehe Abb. 9).

Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtypzellen und die mit Perchlorat inkubierten Zellen beider Zelllinien nach initialer Iodaufnahme einer sehr raschen Efflux mit vollständiger Elimination ab Minute 6.

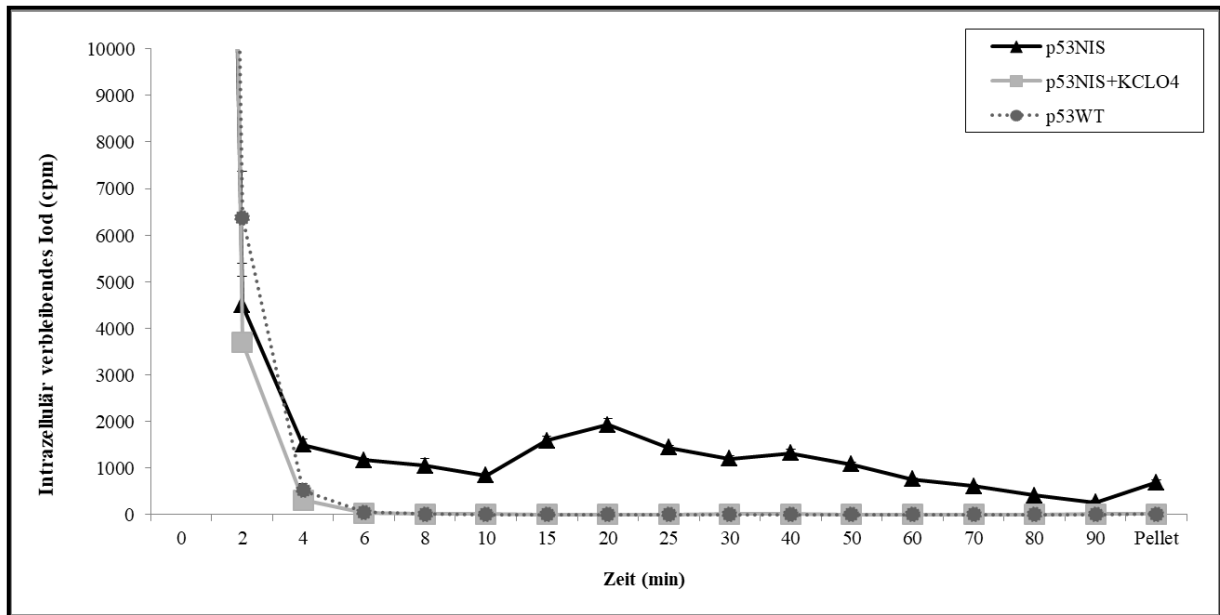


Abb. 8: Iod Efflux. In stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3 Vektor transfizierten p53NIS Zellen war erst nach 80 Minuten das ursprünglich aufgenommene Iodid vollständig aus den Zellen eliminiert. In den Wildtypzellen und den mit Perchlorat inkubierten p53NIS Zellen zeigte sich bereits ab Minute 6 eine vollständige Elimination.

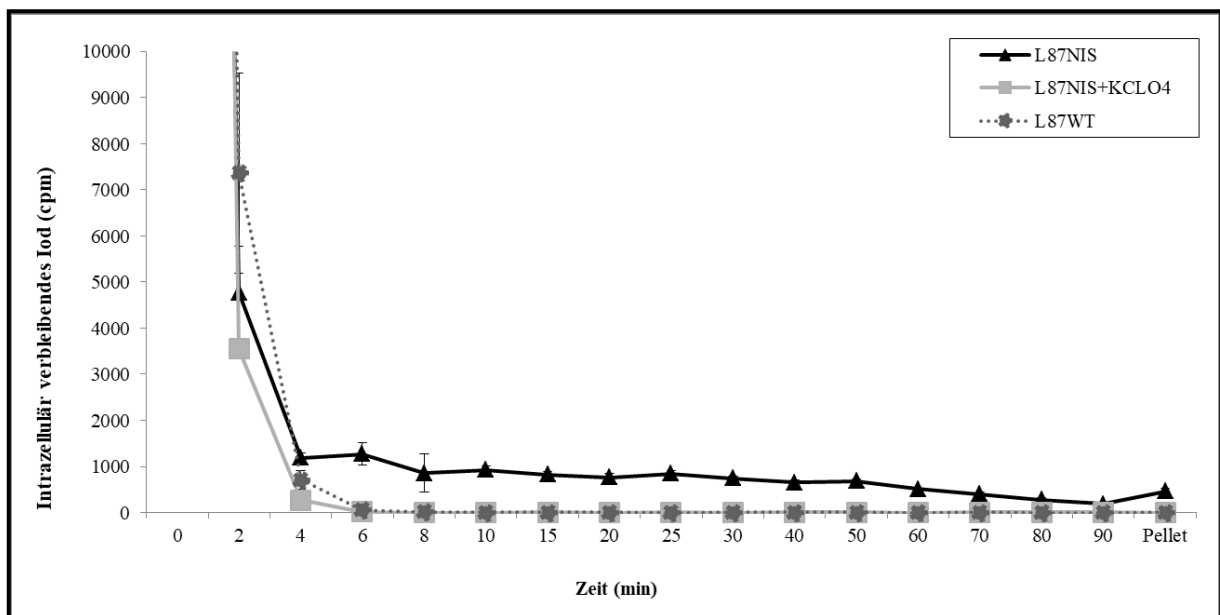


Abb. 9: Iod Efflux. In stabil mit CMV-NIS-pcDNA3 Vektor transfizierten L87NIS Zellen war erst nach 70 Minuten das ursprünglich aufgenommene Iodid vollständig aus den Zellen eliminiert. In den Wildtypzellen und den mit Perchlorat inkubierten L87NIS Zellen zeigte sich bereits ab Minute 6 eine vollständige Elimination.

3.3 Nachweis von NIS mRNA mittels quantitativer PCR

Um die NIS mRNA Expression nach erfolgreicher stabiler Transfektion zu messen, erfolgte nach mRNA Isolierung und Umschreibung in cDNA eine Analyse mittels quantitativer PCR (qPCR) unter Einsatz von NIS spezifischen Oligonuklid-Primern. In den stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten Zelllinien p53NIS und L87NIS zeigte sich ein signifikanter Nachweis von NIS mRNA Expression. Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtypzellen p53WT und L87WT keine erhöhten NIS mRNA Expression (siehe Abb. 10).

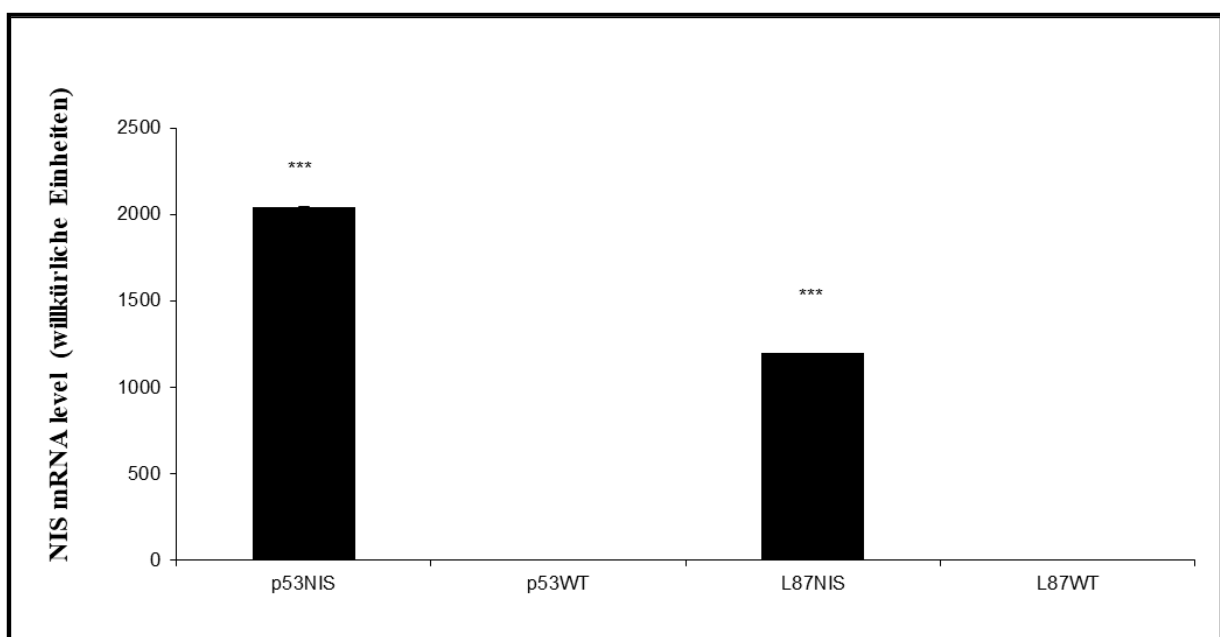


Abb. 10: Nachweis der NIS mRNA mittels qPCR. Es zeigte sich eine signifikante NIS mRNA Expression in den mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten Stammzelllinien p53NIS und L87NIS ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Wildtypzelllinien p53WT und L87WT.

3.4 NIS Protein Nachweis durch Western Blot Analyse

Unter Verwendung eines monoklonalen, gegen humanes NIS-Protein gerichteten Antikörpers der Maus wurde in einem Western-Blot die NIS-Proteinexpression in stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten mesenchymalen Stammzellen (p53NIS und L87NIS) sowie in den Wildtyp Zellen (p53WT und L87WT) untersucht. Dabei ließ sich in den aus den Wildtypzellen isolierten Membran-Proteinen kein NIS Protein nachweisen, während in den

p53NIS und L87NIS Zellen das NIS Protein als Hauptbande von ca. 80-100 kDa nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 11 und 12).

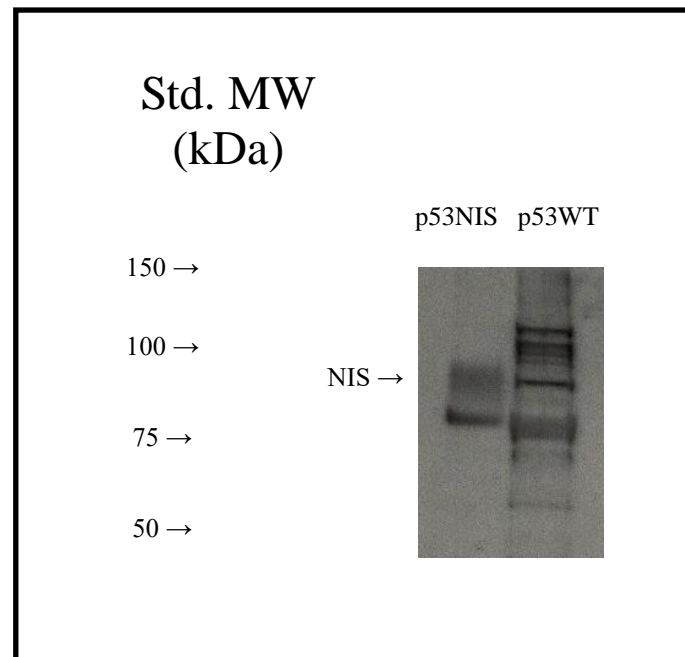


Abb. 11: Western Blot Analyse. Nachweis von NIS-Protein in stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten p53NIS Zellen als Bande von 80 - 100 kDa, in der Wildtyplinie p53WT zeigt sich kein Nachweis einer NIS-spezifischen Bande.

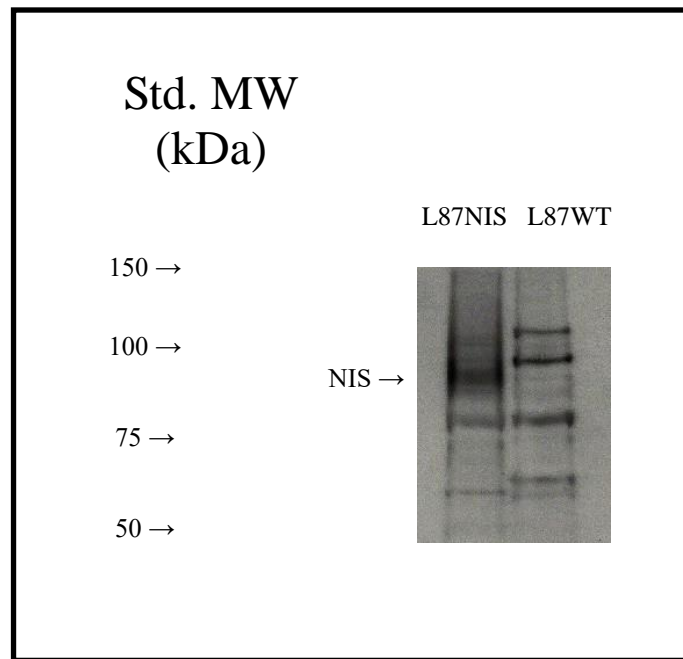


Abb. 12: Western Blot Analyse. Nachweis von NIS-Protein in stabil mit dem CMV-NIS-pcDNA3-Vektor transfizierten L87NIS Zellen als Bande von 80 - 100 kDa, in der Wildtyplinie L87WT zeigt sich kein Nachweis einer NIS-spezifischen Bande.

3.5 Nachweis der Zelltoxizität von ^{131}I od im *in vitro* Clonogenic Assay in Monokulturen

Um den selektiven zytotoxischen Effekt des Radionuklids ^{131}I od in den stabil mit CMV-NIS-pcDNA3 transfizierten Zelllinien p53NIS und L87NIS sowie den Kontroll Wildtypzelllinien p53WT und L87WT zu vergleichen, wurde - wie oben beschrieben - ein *in vitro* Clonogenic Assay durchgeführt.

Während bei den p53NIS Zellen durch die Behandlung mit ^{131}I od 90 % der Zellen getötet wurden, starben von den Wildtypzellen p53WT nur 3 % der Zellen, womit ein signifikanter selektiv zytotoxischer Effekt in p53NIS Zellen, die stabil mit hNIS unter Steuerung des unspezifischen CMV Promoters transfiziert worden waren, gezeigt werden konnte (siehe Abb. 13).

In den L87NIS Zellen wurden durch die Behandlung mit ^{131}I od 60 % der Zellen getötet, wobei von den Wildtypzellen L87WT nur 18 % der Zellen getötet wurden. Auch hier zeigte sich ein signifikanter selektiv zytotoxischer Effekt in L87NIS Zellen, die stabil mit hNIS

unter Steuerung des unspezifischen CMV Promoters transfiziert worden waren (siehe Abb. 14).

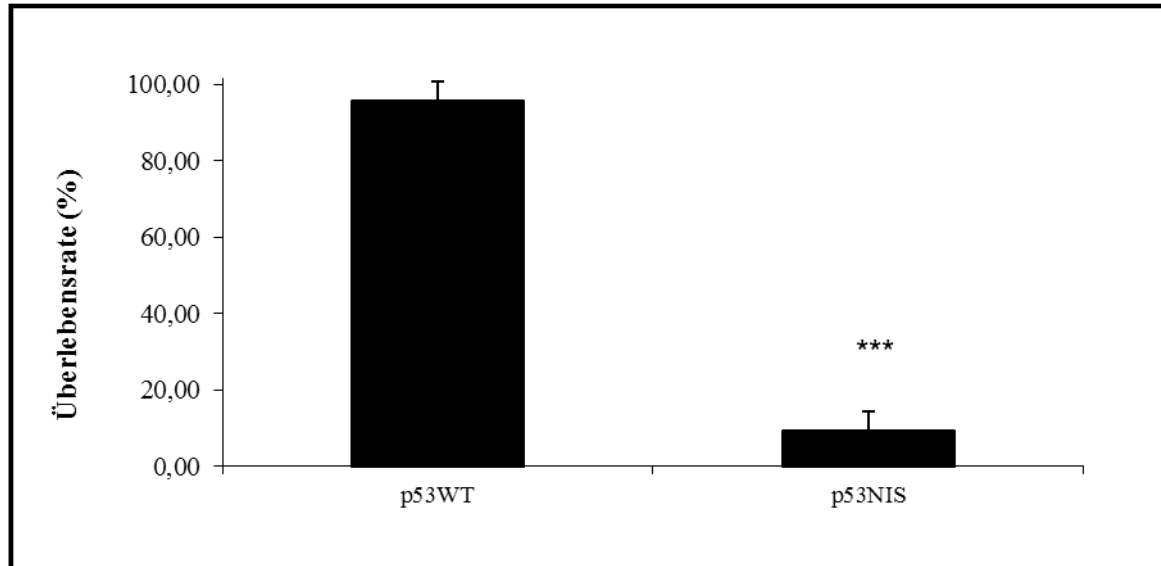


Abb. 13: Nachweis eines selektiv zytotoxischen Effektes von ^{131}I od in stabil mit NIS-transfizierten p53NIS Zellen im Gegensatz zu den Wildtypzellen p53WT ($p < 0,001$). Während 90 % der p53NIS Zellen nach Radionuklidexposition getötet wurden, starben nur 3 % der Wildtypzellen.

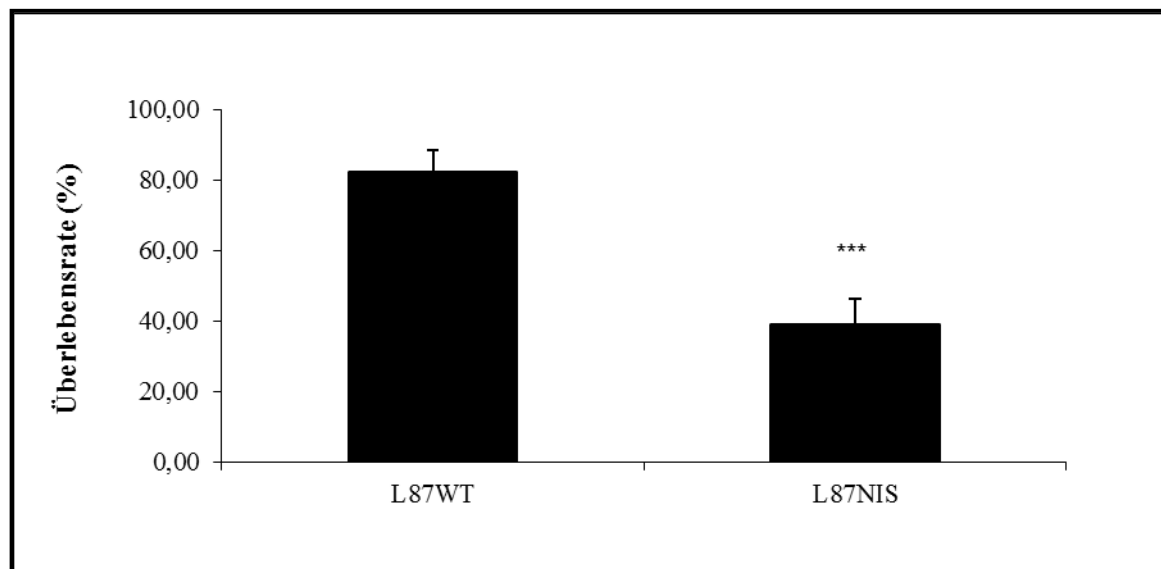


Abb. 14: Nachweis eines selektiv zytotoxischen Effektes von ^{131}I od in stabil mit NIS-transfizierten L87NIS Zellen im Gegensatz zu den Wildtypzellen L87WT ($p < 0,001$). Während 60 % der L87NIS Zellen nach Radionuklidexposition getötet wurden, starben nur 18 % der Wildtypzellen.

3.6 Nachweis der Zelltoxizität von ^{131}I od im *in vitro* Clonogenic Assay in Mischkulturen

Um den selektiven zytotoxischen Effekt des Radiopharmakons ^{131}I od auf Tumorzellen nach MSC-vermitteltem NIS-Gentransfer *in vitro* nachzuahmen wurde ein *in vitro* Clonogenic Assay in Mischkulturen von HCC Zellen mit p53NIS Zellen und von HCC Zellen mit L87NIS Zellen durchgeführt.

Während 40 % der HCC Zellen, welche in Mischkulturen mit den p53NIS MSC in einem 1:1 Verhältnis kultiviert wurden, und 65 % der HCC Zellen, welche in einem 1:2 Verhältnis mit p53NIS MSC kultiviert wurden, durch die Inkubation mit ^{131}I od getötet wurden, was einem signifikanten therapeutischen Effekt entspricht, zeigten die HCC Zellen ohne Kokultivierung mit NIS-transfizierten MSC keine signifikante Wachstumsreduktion nach ^{131}I Exposition (siehe Abb. 15).

Auch in den mit L87NIS kokultivierten HCC Zellen zeigte sich bei einem Mischverhältnis von 1:1 durch die Behandlung mit ^{131}I od ein signifikanter zytoreduktiver Effekt von 50 %. Bei einem Mischverhältnis von 1:2 zeigte sich zwar ein Absterben von 40%, dieses Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Abb. 16).

Diese Ergebnisse zeigen den bereits oben erwähnten „Bystander Effekt“ aufgrund des „Crossfire Effektes“ des β -Strahlers ^{131}I , d.h. nicht nur NIS exprimierende, sondern auch NIS negative benachbarte Zellen werden durch die Reichweite der β -Strahlen zerstört.

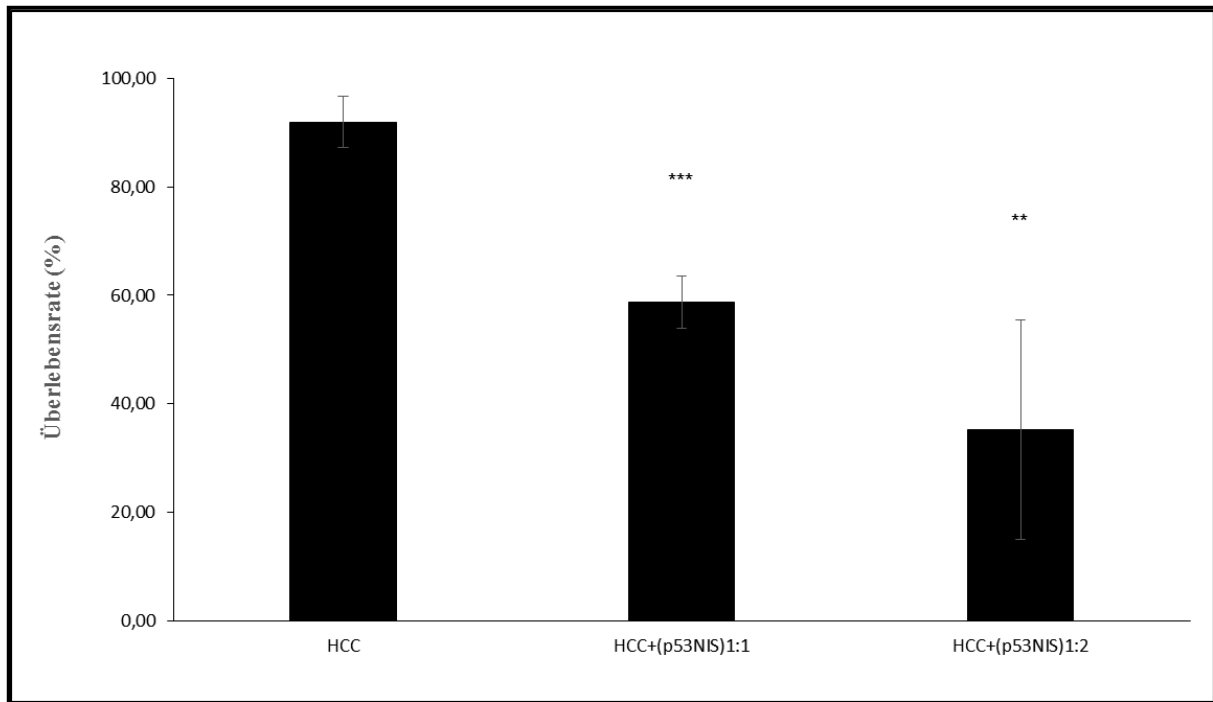


Abb. 15: Nachweis eines selektiv zytotoxischen Effektes von ^{131}I in Mischkulturen von HCC und p53NIS Zellen. Es zeigte sich ein Absterben von 40 % (Verhältnis 1:1) ($p < 0,001$) und 60 % (Verhältnis 1:2) ($p < 0,01$) der HCC Zellen nach Exposition von ^{131}I im Vergleich zu HCC Monokulturen nach ^{131}I Exposition.

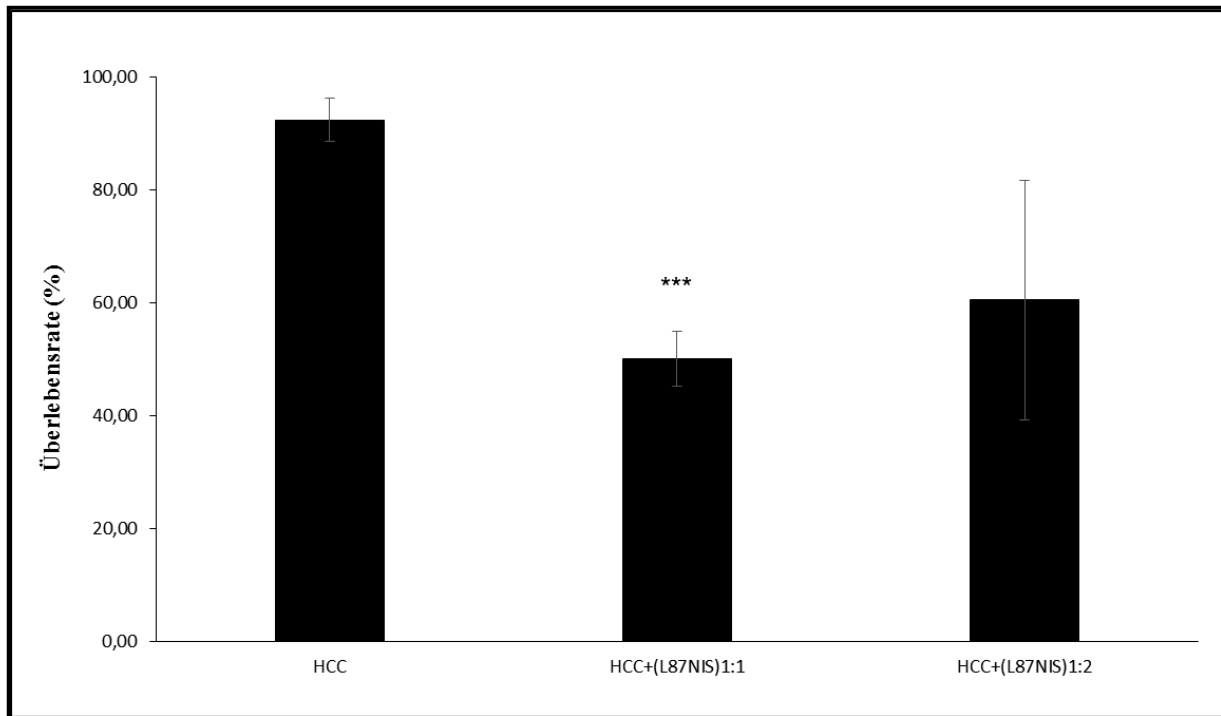


Abb. 16: Nachweis eines selektiv zytotoxischen Effektes von ^{131}I in Mischkulturen von HCC und L87NIS Zellen. Es zeigte sich ein Absterben von 50 % (Verhältnis 1:1) ($p < 0,001$) der HCC Zellen nach Exposition von ^{131}I im Vergleich zu HCC Monokulturen nach ^{131}I Exposition. In den Mischkulturen mit einem Verhältnis von 1:2 zeigte sich zwar ein Absterben von 40 %, dieses Ergebnis ist jedoch nicht statistisch signifikant.

4. DISKUSSION

4.1 Neue Ansätze im systemischen Gentransfer

Seit Klonierung und Charakterisierung des NIS Gens im Jahre 1996 haben diverse Untersuchungen überzeugend das duale Potential des NIS Proteins als diagnostisches und therapeutisches Gen gezeigt. Technologische Fortschritte im Bereich der Radiologie und Nuklearmedizin ermöglichen mittels dreidimensionaler Verfahren wie PET, PET-CT und SPECT einen exakten und hochauflösenden Nachweis der NIS Expression. Um die Therapie nicht nur thyreoidaler sondern auch extrathyreoidaler Tumorerkrankungen im metastasierten Stadium mittels Radioiodtherapie zu ermöglichen, mit dem Ziel maximaler therapeutischer Effektivität bei möglichst minimaler Toxizität, erfolgte die kontinuierliche Untersuchung und Verbesserung der bestehenden Applikationsmöglichkeiten. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung ist die Evaluation von Gentransfermethoden, die eine ausreichende tumor-selektive NIS Expression nicht nur nach lokaler, sondern auch nach systemischer Applikation erzielen können. Mesenchymale Stammzellen konnten hierbei in den letzten Jahren als äußerst viel versprechende Gentransfervehikel charakterisiert werden.

4.1.1 Mesenchymale Stammzellen als Gentransfervehikel

Aufgrund ihres intrinsischen Tumorphomings und ihrer selektiven Rekrutierung ins Tumorstroma stellen MSC ideale tumorspezifische Vehikel dar, welche nach systemischer Applikation gezielt therapeutische Gene in Tumore und ihre Metastasen transportieren können und nur geringe immunologische Effekte auslösen [8]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben MSC eingesetzt, um selektiv diagnostische oder therapeutische Gene zu transportieren, unter anderem Interferon β , tumornecrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL), CX3CL1, HSV-TK, IL-12 [171]; [70]; [167]; [269]; [270]; [271]; [168]; [174]; [182].

Nach stabiler Transfektion mit einem NIS tragenden Plasmid unter Steuerung des unspezifischen CMV Promoters konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die murinen wie auch die humanen mesenchymalen Stammzellen das NIS Protein funktionell aktiv in ihrer Zellmembran exprimieren. In dem durchgeführten ^{125}I -Uptake Assay zeigte sich in den murinen MSC eine bis zu 30-fach höhere und in den humanen MSC eine bis zu 60-fach höhere, Perchlorat-abhängige Iod Akkumulation im Vergleich zu den nicht transfizierten Wildtypzellen. Des Weiteren wurde die NIS Expression auf mRNA Ebene mittels qPCR und auf Protein Ebene mittels Western Blot Analyse nachgewiesen.

Eine *in vitro* Radioiodtherapie wurde unter Verwendung eines *in vitro* Clonogenic Assay durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit dem β -Strahler ^{131}I konnte, trotz des schnellen Iod-Effluxes, ein signifikanter therapeutischer Effekt durch das Absterben der NIS transfizierten MSC sowie benachbarter Tumorzellen, bedingt durch den Crossfire Effekt von ^{131}I gezeigt werden. Dieser betrug bei den murinen MSC 90 % und bei den humanen MSC 60 % im Vergleich zu den Wildtypzellen. Die im Vergleich zu den p53NIS Zellen geringere Absterberate korreliert mit dem geringeren Ioduptake, den der L87NIS Zellklon im Vergleich zum p53NIS Zellklon zeigte. Um den selektiv zytotoxischen Effekt von ^{131}I in einem der Tumorarchitektur näheren Modell zu untersuchen, erfolgte ein *in vitro* Clonogenic Assay von Kokulturen bestehend aus humanen Leberkarzinomzellen (HCC) und den MSCs. In diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass ein Mischverhältnis HCC:MSC von 1:1 oder 1:2 ausreichend ist, um einen therapeutischen Effekt in den Tumorzellen durch den Crossfire des von den MSC akkumulierten ^{131}I zu erreichen. Dieser betrug bei den HCC Zellen, welche mit den murinen p53NIS MSC kokultiviert wurden, zwischen 40 % und 65 % und bei den HCC Zellen, welche mit den humanen L87NIS MSC kokultiviert wurden, 40 % bis 50 %. Dies ist durch den bereits beschriebenen „Crossfire-Effekt“ des β -Strahlers ^{131}I bedingt, welcher durch seine therapeutische Reichweite von bis zu 2,4 mm auch benachbarte Tumorzellen zerstört. Trotz der Monolayer Ausplattierung ist die Applikation von ^{131}I ausreichend für einen therapeutischen Effekt, obwohl gezeigt werden konnte dass eine dreidimensionale Anordnung wie z.B. in Spheroidkulturen oder wie sie physiologischerweise in Tumoren zu finden ist, den Effekt von ^{131}I noch potentieren kann [272]; [273]. Auch in diesem Versuch zeigte sich ein erhöhter therapeutischer Effekt unter Verwendung der murinen MSC, was wiederum mit deren überlegenen Iodakkumulation korreliert. Zusammenfassend konnte diese *in vitro* Charakterisierung eindrücklich zeigen, dass MSC nach NIS Transfektion eine signifikante, funktionell aktive NIS Expression auf Protein- und mRNA-Ebene nachweisen und nach Inkubation mit ^{125}I eine signifikante Iodakkumulation zeigen. Nach Inkubation mit ^{131}I konnte ein therapeutischer Effekt in den NIS-transfizierten MSCs und in den benachbarten Tumorzellen nachgewiesen werden.

In weiterführenden *in vivo* Studien unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung der im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierten und charakterisierten NIS-transfizierten murinen und humanen MSC, konnte *in vivo* mittels molekularer Bildgebung, sowie *ex vivo* mittels immunhistochemischer Färbung gezeigt werden, dass die stabil mit NIS transfizierten L87NIS MSCs nach i.v. Applikation aktiv ins Tumorstroma von HCC Xenotransplantat Tumoren rekrutiert werden und dort eine Radioiodakkumulation von 7 – 9 % ID/g mit einer

biologischen Halbwertszeit von 4 h induzieren. Interessanterweise zeigte sich auch eine Akkumulation von MSC in der Milz, welche durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen wurde, diese Population zeigte jedoch keine NIS Expression und induzierte auch keine Iodakkumulation. Dies lässt vermuten, dass MSC zwar auch in die Milz rekrutiert werden, dort aber einen unterschiedlichen Differenzierungs- und Aktivierungsprozess durchlaufen. Zusätzlich zeigte sich nach ^{131}I Applikation von 1,5 mCi (55,5 MBq) eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums in der Therapiegruppe [166]. Trotz dieser erfolgversprechenden Ergebnisse einer selektiven NIS Expression, welche auf das selektive Tumorphoming von MSCs zurückzuführen sind, bleibt als oberste Ziel das Erreichen einer noch besseren Tumorselektivität mit minimalen Nebenwirkungen in gesunden Organen, welches wie bereits erwähnt, durch transkriptionelles Targeting mithilfe von gewebespezifischen Promotoren erreicht werden kann [274]. Da MSCs auch in gesunde Organe rekrutiert werden können, könnte sich die Verwendung des unspezifischen CMV Promoters nachteilig auf gesunde Gewebe auswirken [166], weshalb in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe die Verwendung von Promotoren untersucht wurde, die selektiv im Tumormilieu aktiviert werden.

Zu diesem Zweck untersuchten *Knoop et al.* in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Spitzweg den Einsatz von MSCs, die genetisch so modifiziert wurden, dass sie NIS unter Steuerung des RANTES/CCL5 Promoters exprimieren. Aufgrund der zentralen Rolle von RANTES (Regulated on Activation, normal T-cell Expressed and presumably secreted)/CCL5 im Rahmen der MSC Tumorrekutierung und Aktivierung zu Karzinom-assoziierten Fibroblasten, wurde dieser Promotor eingesetzt um die Tumorstroma-Selektivität der MSC-vermittelten NIS Expression zu erhöhen [131].

In 67 % der subkutan implantierten humanen hepatozellulären Xenograft Tumore konnte nach *in vivo* Applikation von RANTES-NIS-MSC über die Schwanzvene, eine aktive Rekrutierung im Tumorstroma durch ^{123}I Szintigraphie detektiert werden, welche zu einer Radioiodakkumulation von ca. 6 – 7 % ID/g mit einer biologischen Halbwertszeit von 3,7 h führte. Auch nach therapeutischer Applikation von 1,5 mCi (55,5 MBq) ^{131}I , respektive ^{188}Re konnte eine signifikante Verlangsamung der Tumorentwicklung im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden [131].

Als weiterer Schritt wurde die NIS Expression in einem metastatischen Kolonkarzinommodell untersucht. Nach intrasplenischer Tumorzellinjektion und drauffolgender Splenektomie in CD 1 nu/nu Mäusen und RANTES-NIS-MSC Applikation zeigte sich in der durchgeführten ^{123}I Szintigraphie ein maximaler Iod Uptake von $12,1 \% \pm 2,6 \% \text{ ID/g}$ mit einer tumorabsorbierten

Dosis von 63,2 mGy/MBq, als Folge einer Tumorstroma spezifischen Rekrutierung der MSCs mit NIS Expression nach RANTES/CCL5 Promoter Aktivierung im Tumorstroma der Kolonkarzinom-Lebermetastasen [132]. Diese Ergebnisse konnten mittels ^{124}I PET Untersuchung bestätigt werden und lieferten zusätzlich ein deutlich besseres anatomisches Korrelat, mit einer detaillierteren dreidimensionalen Analyse der NIS vermittelten Radioiodakkumulation in den einzelnen Kolonkarzinom-Metastasen. In den Therapiegruppen zeigte sich darüber hinaus eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit einer hepatischen Tumorlast von mindestens 80 %, zeigten die Therapiegruppen eine deutlich reduzierte Tumorlast von 60 %, was in Anbetracht des aggressiven Tumorwachstums in diesem Tumormodell ein beeindruckender Therapieeffekt ist [132].

Die tumorbedingte Hypoxie, welche durch die rapide Proliferation von Tumorzellen und dadurch bedingte Erschöpfung der Sauerstoffzufuhr verursacht wird [275]; [276] stellt ein weiteres wichtiges Target in der Tumorthherapie dar. Hypoxische Tumorzellen zeigen sich gegenüber konventionellen Therapien wie Chemotherapie oder Bestrahlung resistenter als normoxische Tumorzellen und sind mit einem maligneren Phänotyp assoziiert [277]; [278]. *Müller et al.* in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Spitzweg untersuchten in einem orthotopen Lebertumor Mausmodell den Effekt einer Radioiodtherapie nach Applikation von MSC, die NIS unter Steuerung eines Hypoxie-responsiblen Promotors exprimierten, unter Verwendung von Hypoxia-inducible factor (HIF) 1 responsiven Elementen, welchen eine Schlüsselrolle während der zellulären Antwort unter hypoxischen Bedingungen zukommt [275]; [276]; [279]; [280]; [281]. Nach Applikation einer therapeutischen Dosis ^{131}I zeigte sich ein verlangsamtes Tumorwachstum und eine reduzierte Tumorperfusion was zu einem verlängerten Überleben der tumortragenden Mäuse in der Therapiegruppe führte [281].

Die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe und das Proof of Principle des tumorspezifischen NIS Gentransfers eröffnen neue Möglichkeiten für die klinische Anwendbarkeit der MSC vermittelten NIS Gentherapie unter Verwendung von NIS als Reporter- und Therapiegen.

4.1.2 Potentielle Rolle von MSC in der Tumorentstehung

Trotz dieses vielversprechenden Potentials, das der MSC-vermittelte Gentransfer bietet, sollte die potentielle Rolle einer MSC-vermittelten Förderung des Tumorwachstums nicht außer Acht gelassen werden [9]. Wie bereits oben erwähnt, zeigen MSC einen Tumortropismus und infiltrieren das Tumorstroma. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch die

Interaktion der MSC mit den Tumorzellen, das Tumorwachstum gefördert wird [282]; [283]; [284]; [285]. *Karnoub et al.* haben humane, aus dem Knochenmark gewonnene MSC, mit dem green fluorescent Protein markiert und zusammen mit vier unterschiedlichen humanen Brustkarzinomzellen (MCF/Ras, MDA-MB-23, MDA-MB435, HMLER) in einem Verhältnis von 3:1 in immuninkompetente Mäuse koinjiziert. Die MSC beschleunigten das Tumorwachstum in einer der Zelllinien (MCF/Ras), haben jedoch in den anderen untersuchten Zelllinien kein lokales Tumorwachstum hervorgerufen. Die Koinjektion der Karzinomzellen mit MSC hat jedoch die Anzahl der entstandenen Metastasen aller beteiligten Zelllinien gefördert [282]. *Zhu et al.* haben in einem murinen Xenograftmodell MSC fetalen und adulten Ursprungs zusammen mit Kolonkarzinomzellen verabreicht, was zu einem Auftreten von Tumoren mit erhöhter Vaskularisation und Nekrosen geführt hat [284]. *Djouad et al.* konnten zeigen dass B16 Melanomzellen im allogenen Mausmodell nur dann Tumore geformt haben, wenn sie zusammen mit MSC verabreicht wurden [285].

Die Mechanismen, die zu einer Förderung des Tumorwachstums beitragen könnten, sind die Transition der MSC in Tumor-assoziierte Fibroblasten, die Suppression der Immunantwort, die Förderung der Neoangiogenese, die Stimulation der epithelialen-mesenchymalen Transition und die Veränderung der Tumormikroumgebung durch Inhibition der tumoralen Apoptose und Förderung des metastatischen Potentials [286].

Interessanterweise wurden von weiteren Arbeitsgruppen gegensätzliche Ergebnisse berichtet, welche eine Inhibition des Tumorwachstums nach MSC Applikation belegen [287]; [165]; [288]; [289]. *Ohlsson et al.* konnten zeigen dass MSC das Wachstum von Kolonkarzinomen der Ratte unterdrücken, wenn sie in gleicher Anzahl oder in 10-fach höherer Dosis als die Karzinomzellen appliziert wurden [287]. *Khakoo et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass MSC im Gegensatz zu aus der Umbilikalvene gewonnenen, humanen endothelialen Zellen, das Tumorwachstum von Kaposi Sarkomen inhibieren [165]. *Qiao et al.* konnten zeigen, dass humane, fetale MSC das Wachstum von humanen Leberkarzinomzellen hemmen. Sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* zeigte sich eine reduzierte Proliferation und reduzierte Expression von Onkogenen. Bei gleichzeitiger Applikation der MSC und der Tumorzellen zeigte sich eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine Reduktion der Tumorgröße [288]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte unter Verwendung der gleichen MSC zeigen, dass diese das Wachstum von MCF-7 Brustkarzinomzellen *in vitro* hemmen [289].

Mögliche Wirkmechanismen die der tumorsuppressiven Wirkung von MSC zugrundeliegen könnten, sind die Erhöhung der inflammatorischen Infiltration des Tumors durch die MSC,

die Suppression der Wnt und AKT Signalwege, die Regulation des Zellzyklus und die Induktion der Apoptose der Tumor- und epithelialen Zellen [286].

Letztlich liegt eine kontroverse Datenlage zum Einfluss von MSC auf das Tumorstadium vor, weshalb ein detaillierteres Verständnis der MSC-Biologie im Tumormilieu eine wichtige Voraussetzung für die Translation in die Klinik, im Rahmen tumorselektiver Gentherapieansätze, darstellt [9].

4.2 Effizienzerhöhung der NIS Gentherapie

4.2.1 Verwendung alternativer Radionuklide

4.2.1.1 ¹⁸⁸Rhenium

Obwohl die Kombination des NIS Gentransfers mit dem Radionuklid ¹³¹I eine effektive Therapiestrategie für sowohl thyreoidale wie auch extrathyreoidale Tumore darstellt [214]; [243]; [250]; [231]; [290]; [248] haben einige Arbeitsgruppen über einen limitierten therapeutischen Effekt aufgrund eines raschen Iodeffluxes von ¹³¹I nach NIS Gentransfer berichtet [291]; [292]; [293].

Bei Tumoren mit geringer NIS Expression bzw. raschem Iod Efflux nach NIS Gentransfer, kann durch die Applikation alternativer und potenter Radionuklide anstelle von ¹³¹I die therapeutische Effizienz erhöht werden [191]. Eine überaus wirkvolle Option stellt der β -Strahler ¹⁸⁸Re dar. Rhenium wird in einer Vielzahl von therapeutischen Anwendungen, inklusive Radioimmuntherapie, Palliation von skeletalen Schmerzen und endovaskulärer Brachytherapie eingesetzt [294]; [295]; [296]; [297]. ¹⁸⁸Re ist charakterisiert durch eine vergleichsweise zu ¹³¹I (Halbwertszeit 8 d, E= 0,134 MeV, therapeutische Reichweite etwa 2,6 - 5 mm) deutlich kürzeren Halbwertszeit von 16,7 h und höheren Beta Energie (E=0,764 MeV) mit einer entsprechend größeren maximalen therapeutischen Reichweite von 23 - 32 mm, welche bei der Therapie von Tumoren mittleren bis großen Volumens aufgrund eines höheren „Crossfire Effektes“ von Vorteil wäre [191]; [298]. Ein zusätzlicher Vorteil entsteht durch die niedrigere Anzahl von γ -Photonen (155 keV), die leichter abzuschirmen sind als die 364 keV Photonen des ¹³¹I [299].

Dadachova et al. konnten erfolgsversprechende Ergebnisse im NIS exprimierenden Mammakarzinom Xenotransplantatmodell zeigen, mit einer NIS abhängigen ¹⁸⁸Re Akkumulation, welche zu einer 4,5-fach höheren absorbierten Dosis im Vergleich zu ¹³¹I

fürte [191]; [300]. Weiterführende Studien der gleichen Arbeitsgruppe zeigten, dass sowohl ^{188}Re als auch ^{131}I zu einer deutlichen Verlangsamung des Tumorwachstums geführt haben, wobei ^{188}Re effizienter war als ^{131}I [299]. Außerdem zeigte sich ein protektiver Effekt auf die Schilddrüse, welcher hauptsächlich durch die fehlende Organifizierung des ^{188}Re in Schilddrüsenfollikelzellen im Gegensatz zu ^{131}I bedingt ist. Durch die Elimination dieses „Thyroid sink“ Effektes entsteht eine erhöhte tumorale ^{188}Re Aufnahme und eine Reduktion des Bestrahlungsschadens an der Schilddrüse [300].

Ähnliche Ergebnisse konnten auch andere Arbeitsgruppen, inklusive unserer eigenen vorweisen [301]; [251]; [131]; [302]; [303]; [304].

Willhauck et al. in unserer Arbeitsgruppe konnten in *in vitro* Versuchen zeigen, dass zwar das NIS Protein eine höhere Affinität zu ^{125}I als ^{188}Re hat, trotzdem zeigte sich in den *in vivo* Versuchen mit NIS transfizierten Prostatakarzinom Xenotransplantaten eine 4,7-fach höhere absorbierte Dosis für ^{188}Re im Vergleich zu ^{131}I . Des Weiteren zeigte sich nach einer Applikation von jeweils 1,5 mCi (55,5 MBq) ^{188}Re und ^{131}I eine ähnliche Volumenreduktion von 86 % bei kleineren Tumoren, jedoch ein signifikanter Unterschied von 86 % (^{188}Re) gegenüber 73 % (^{131}I) bei größeren Tumoren [301].

Auch *Klutz et al.* in unserer Arbeitsgruppe haben in einem HCC Xenograft Mausmodell die Effektivität von ^{131}I und ^{188}Re verglichen, konnten jedoch im Vergleich zu *Willhauck et al.* und *Dadachova et al.*, trotz der signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Radionukliden zeigen [251]. Gründe dafür könnten ein inhomogenes NIS Expressionsmuster sein, oder aber ein kleineres Tumolvolumen, welches die Vorteile des „Crossfire Effektes“, bedingt durch die größere therapeutische Reichweite des ^{188}Re , nicht vollständig ausnutzen konnte.

In einer weiterführenden Arbeit untersuchten *Knoop et al.* nach MSC vermitteltem NIS Gentransfer die zytotoxischen Effekte von ^{131}I und ^{188}Re und konnten zwar eine signifikante jedoch ähnliche therapeutische Effizienz für beide Radionuklide zeigen, obwohl die dosimetrischen Berechnungen eine 3-fach höhere absorbierte Dosis für ^{188}Re gezeigt hatten. Mögliche Ursachen dafür könnten sein, dass die dosimetrischen Kalkulationen für einen homogenen tumoralen Radionukliduptake optimiert sind und mikrodosimetrische Aspekte oder eine inhomogene Verteilung der MSC innerhalb des Tumorstromas nicht in Betracht gezogen werden [131].

Obwohl die ^{188}Re Applikation ein vielversprechender Ansatz für die Steigerung der Effektivität des NIS-Gentherapieansatzes darstellt, ist die bisher vorliegende Datenlänge

kontrovers, weshalb weitere Untersuchungen erforderlich sind, um das Potential für die klinische Anwendung abschließend beurteilen zu können.

4.2.1.2 $^{211}\text{Astat}$

Auch der α -Strahler $^{211}\text{Astat}$ (^{211}At), das schwerste Element in der Gruppe der Halogene, mit einer Halbwertszeit von 7,2 h, Energie von 6,8 MeV und einem linearen Energietransfer (LET) von 97 keV/ μm [305] wird von NIS transportiert und in NIS exprimierenden Zellen akkumuliert, wie in verschiedenen mit NIS DNA stabil transfizierten Tumorzelllinien gezeigt werden konnte [191]; [306]; [307]; [308]; [305]. *Carlin et al.* zeigten, dass die Behandlung von NIS exprimierenden Gliomzellen mit ^{211}At in einer höheren absorbierbaren Dosis und damit verbundener erhöhter zytotoxischer Effektivität resultierte. Ein weiterer Faktor der dies begünstigt, ist die kurze Reichweite (70 μm) von α -Strahlern. Diese Eigenschaft macht sie insbesondere für die Therapie von Mikrometastasen sehr interessant, um die Bestrahlungsdosis des umliegenden gesunden Gewebes zu limitieren [305].

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte in einem stabil mit NIS transfizierten Prostatakarzinommodell gezeigt werden, dass sowohl in der Bildgebung wie auch in der Therapie, ^{211}At ein wirkungsvolles, alternatives Radionuklid vor allem bei kleineren Tumoren darstellt [309].

Auch in den *in vivo* Versuchen von *Petrich et al.* konnte gezeigt werden, dass ^{211}At in verschiedenen Xenotransplantatmodellen (Glioblastom-, papilläre- und anaplastische Schilddrüsenkarzinom- und Kolonkarzinomzellen) aufgenommen wird und bis zu 60-fach höher als in den Kontrollzellen akkumuliert wird [306]. Zusätzlich wurde in einer papillären Schilddrüsenkarzinomzelllinie gezeigt, dass eine 14-fach gesteigerte tumorabsorbierte Dosis nach Applikation von ^{211}At im Vergleich zu ^{131}I erreicht wurde. Auf ein Xenotransplantat Mausmodell übertragen, zeigte sich sogar nach repetitiver Applikation von insgesamt 67,6 μCi (2,5 MBq) eine komplette Remission der Tumore nach 90 Tagen, ohne ein Rezidiv während der Beobachtungszeit [306]; [307].

Zusammenfassend sind die Vorteile von ^{211}At nicht nur die höhere lineare Energie, die kürzere Reichweite ($\sim 60 \mu\text{m}$) sondern auch, dass die zytotoxischen Effekte der α -Partikel nicht durch die Dosis, dem Zeitpunkt der Zelle im Zellzyklus und dem Sauerstoffpartialdruck beeinflusst werden, Faktoren die die Effektivität der β -Strahler beeinflussen [308]; [310].

4.2.2 Radioiodtherapie in Kombination mit Radiosensitizern

In einer kürzlich publizierten Studie konnten *Renier et al.* zeigen, dass ein dualer Behandlungsansatz bestehend aus Radioiodtherapie und Applikation von Gemcitabine, eines zytotoxischen Radiosensitizers, zu einer eindrucksvollen Inhibition des Tumorwachstums im Vergleich zu der jeweiligen Monotherapie führte. Solide Mammakarzinome wie auch zerebrale Mammakarzinommetastasen wurden mittels NIS exprimierenden Mammakarzinomzellen nach lentiviralen Gentransfer generiert. In diesem Mammakarzinommodell zeigten die soliden Tumore nach kombinierter Therapie von 4 Applikationen Gemcitabine (58 mg/kg) und 4 Applikationen ^{131}I (1 mCi) eine höhere Inhibition des Tumorwachstums als nur durch Monotherapie.

Des Weiteren zeigte die duale Behandlung der zerebralen Metastasen mittels hochdosiertem Gemcitabine (4 x 58 mg/kg) und ^{131}I (2 x 1 mCi) eine 89 % Tumorrogression und mittels niedrig dosiertem Gemcitabine (14,5 mg/kg) und ^{131}I (2 x 0,5 mCi) eine 57 % Reduktion. Obwohl nur maximal 25 % der Zellen eine NIS Expression gezeigt haben, war diese aufgrund des „Bystander Effektes“ von NIS schon ausreichend um eine deutliche Tumorreduktion zu erreichen. Außerdem hat die Kombination mit einem Radiosensitizer wie Gemcitabine dazu geführt, dass eine therapeutische Effektivität mit einer niedrigeren Bestrahlungsdosis erreicht werden konnte, die als Monotherapie nicht ausreichend für einen Therapieeffekt gewesen wäre.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Gemcitabine Tumorzellen für die Therapie mit ^{131}I sensibilisiert, was eine Steigerung des Therapieeffektes einer Radioiodtherapie nach NIS-Gentransfer ermöglicht oder eine Reduktion der applizierten Aktivität, um die Toxizität gering zu halten [273].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Tumorerkrankungen sind die führende Sterbeursache mit steigender Inzidenz. Neben den bereits etablierten Therapieformen ist es daher von essentieller Bedeutung neue therapeutische Optionen zu entwickeln, welche eine höchstmögliche Effizienz bei geringem Nebenwirkungspotential bieten. Aktuelle Fortschritte in der Stammzellforschung erlauben in diesem Zusammenhang, mesenchymale Stammzellen als therapeutische Vehikel für einen spezifischen Gentransfer im Rahmen innovativer Gentherapieansätze zu nutzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden murine und humane mesenchymale Stammzellen mit einem Natrium/Iodid-Symporter (NIS) exprimierenden Plasmid stabil transfiziert. Die Steuerung der NIS Expression erfolgte unspezifisch unter Steuerung des CMV Promotors und wurde auf mRNA und Proteinebene bestätigt. Die stabil transfizierte murine Stammzelllinie p53NIS zeigte eine ca. 30-fach höhere Iodakkumulation im Vergleich zu der nativen p53WT Zelllinie. Ein ähnliches Iodakkumulationsverhalten zeigte auch die humane Stammzelllinie L87NIS, welche Iod bis zu 60-fach im Vergleich zu der nativen L87WT Zelllinie akkumulierte. Trotz eines sehr raschen Iodeffluxes aus beiden Zelllinien von über 90 % nach 4 Minuten konnte in einem *in vitro* Clonogenic Assay ein signifikanter therapeutischer Effekt von über 90% in den murinen MSC bzw. 60 % in den humanen MSC nach Applikation von ^{131}I gezeigt werden. Um einen Therapieeffekt des in den MSC akkumulierten ^{131}I auf die benachbarten Tumorzellen aufgrund des Crossfire Effektes zeigen zu können, wurde der *in vitro* Clonogenic Assay in Kokulturen von humanen Leberkarzinomzellen und mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Dabei konnte ein signifikanter Therapieeffekt von ^{131}I nachgewiesen werden, welcher abhängig vom Mischverhältnis war.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit genetische modifizierte murine und humane MSCs etabliert und charakterisiert werden, die NIS unter Steuerung des CMV Promotors exprimieren. Diese MSC Linien bildeten die Grundlage für weiterführende *in vivo* Studien von *Knoop et al.* in der eigenen Arbeitsgruppe, die eindrücklich das Potential des MSC-vermittelten NIS Gentransfers in unterschiedlichen Tumormodellen zeigen konnten. Dadurch werden neue Möglichkeiten eröffnet, die bereits seit 70 Jahren bei der Behandlung des Schilddrüsenkarzinoms etablierte Radioiodtherapie auch auf die Therapie nicht thyreoidaler Tumoren zu erweitern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. World Health Organization Cancer Fact Sheet Number 297.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
3. Amer, M.H., *Gene therapy for cancer: present status and future perspective*. Mol Cell Ther, 2014. **2**: p. 27.
4. Cross, D. and J.K. Burmester, *Gene therapy for cancer treatment: past, present and future*. Clin Med Res, 2006. **4**(3): p. 218-27.
5. Conrad, C., et al., *Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery*. Curr Gene Ther, 2007. **7**(4): p. 249-60.
6. Wirth, T., N. Parker, and S. Yla-Herttuala, *History of gene therapy*. Gene, 2013. **525**(2): p. 162-9.
7. (FDA), U.F.a.D.A., *Cellular and Gene Therapy Products, Approved Products*.
8. Tang, C., et al., *Concise review: Nanoparticles and cellular carriers-allies in cancer imaging and cellular gene therapy?* Stem Cells, 2010. **28**(9): p. 1686-702.
9. Dwyer, R.M., et al., *Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer*. Stem Cell Res Ther, 2010. **1**(3): p. 25.
10. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
11. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
12. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
13. Von Luttichau, I., et al., *Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(3): p. 329-36.
14. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
15. Fibbe, W.E. and W.A. Noort, *Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **996**: p. 235-44.
16. Liechty, K.W., et al., *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1282-6.
17. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
18. Fritz, V. and C. Jorgensen, *Mesenchymal stem cells: an emerging tool for cancer targeting and therapy*. Curr Stem Cell Res Ther, 2008. **3**(1): p. 32-42.
19. Baddoo, M., et al., *Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection*. J Cell Biochem, 2003. **89**(6): p. 1235-49.
20. Boiret, N., et al., *Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow*. Exp Hematol, 2005. **33**(2): p. 219-25.
21. Conget, P.A. and J.J. Minguell, *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells*. J Cell Physiol, 1999. **181**(1): p. 67-73.
22. Dennis, J.E., et al., *The STRO-1+ marrow cell population is multipotential*. Cells Tissues Organs, 2002. **170**(2-3): p. 73-82.
23. Gronthos, S., et al., *Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1827-35.
24. Bobis, S., D. Jarocha, and M. Majka, *Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications*. Folia Histochem Cytobiol, 2006. **44**(4): p. 215-30.
25. Stagg, J., *Mesenchymal stem cells in cancer*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(2): p. 119-24.
26. Kumar, S., D. Chanda, and S. Ponnazhagan, *Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells*. Gene Ther, 2008. **15**(10): p. 711-5.

27. Devine, S.M. and R. Hoffman, *Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(6): p. 358-63.
28. Colter, D.C., I. Sekiya, and D.J. Prockop, *Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7841-5.
29. Dazzi, F., et al., *The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis*. Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 161-71.
30. Katz, A.J., et al., *Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 412-23.
31. Vaananen, H.K., *Mesenchymal stem cells*. Ann Med, 2005. **37**(7): p. 469-79.
32. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
33. Barrilleaux, B., et al., *Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells*. Tissue Eng, 2006. **12**(11): p. 3007-19.
34. De Bari, C., F. Dell'Accio, and F.P. Luyten, *Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(1): p. 85-95.
35. Williams, J.T., et al., *Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes*. Am Surg, 1999. **65**(1): p. 22-6.
36. Asakura, A., M. Komaki, and M. Rudnicki, *Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation*. Differentiation, 2001. **68**(4-5): p. 245-53.
37. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
38. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
39. Sabatini, F., et al., *Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities*. Lab Invest, 2005. **85**(8): p. 962-71.
40. Lama, V.N., et al., *Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 989-96.
41. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. Br J Haematol, 2000. **109**(1): p. 235-42.
42. Fukuchi, Y., et al., *Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential*. Stem Cells, 2004. **22**(5): p. 649-58.
43. Igura, K., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta*. Cytotherapy, 2004. **6**(6): p. 543-53.
44. Tsai, M.S., et al., *Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1450-6.
45. Zvaifler, N.J., et al., *Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*. Arthritis Res, 2000. **2**(6): p. 477-88.
46. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2396-402.
47. Miura, M., et al., *SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5807-12.
48. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1338-45.
49. Shih, D.T., et al., *Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue*. Stem Cells, 2005. **23**(7): p. 1012-20.
50. De Coppi, P., et al., *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 100-6.
51. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.

52. Deans, R., *Mesenchymal stem cells: cell and gene therapy applications*. Eur Cytokine Networks, 2000(11): p. 323-324.
53. Toksoz, D., et al., *Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7350-4.
54. Beresford, J.N., *Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow*. Clin Orthop Relat Res, 1989(240): p. 270-80.
55. Haynesworth, S.E., et al., *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone, 1992. **13**(1): p. 81-8.
56. Dexter, T.M., T.D. Allen, and L.G. Lajtha, *Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro*. J Cell Physiol, 1977. **91**(3): p. 335-44.
57. Choudhury, C., *Role of the microenvironment on hematopoiesis. I. Stem cell differentiation into granulocytic and megakaryocytic cell lineage*. J Lab Clin Med, 1989. **114**(4): p. 378-81.
58. Choudhury, C. and R. Sparks, *Role of the microenvironment on hematopoiesis. II. Regulation of cell kinetics in vitro during granulopoiesis and megakaryocytopoiesis*. J Lab Clin Med, 1989. **114**(4): p. 382-8.
59. Gordon, M.Y., et al., *Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro*. Exp Hematol, 1990. **18**(7): p. 837-42.
60. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha*. J Cell Physiol, 1996. **166**(3): p. 585-92.
61. Lazarus, H.M., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections*. J Hematother, 1997. **6**(5): p. 447-55.
62. Verfaillie, C.M., *Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process*. Blood, 1998. **92**(8): p. 2609-12.
63. Fernandez, M., et al., *Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients*. Bone Marrow Transplant, 1997. **20**(4): p. 265-71.
64. Watt, F.M. and B.L. Hogan, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1427-30.
65. Rombouts, W.J. and R.E. Ploemacher, *Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 160-70.
66. Francois, S., et al., *Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 1020-9.
67. Lu, D., et al., *Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome*. Neuroreport, 2001. **12**(3): p. 559-63.
68. Chen, J., et al., *Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats*. J Neurol Sci, 2001. **189**(1-2): p. 49-57.
69. Chen, J., et al., *Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats*. Stroke, 2001. **32**(4): p. 1005-11.
70. Studeny, M., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors*. Cancer Res, 2002. **62**(13): p. 3603-8.
71. Studeny, M., et al., *Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(21): p. 1593-603.
72. Jin, H., et al., *A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 652-62.
73. Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, *Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10711-6.

74. Woodbury, D., et al., *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. J Neurosci Res, 2000. **61**(4): p. 364-70.
75. Herrera, M.B., et al., *Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury*. Kidney Int, 2007. **72**(4): p. 430-41.
76. Chapel, A., et al., *Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome*. J Gene Med, 2003. **5**(12): p. 1028-38.
77. Mahmood, A., et al., *Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells*. Neurosurgery, 2003. **53**(3): p. 697-702; discussion 702-3.
78. Li, M. and S. Ikehara, *Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair*. Stem Cells Int, 2013. **2013**: p. 132642.
79. Ortiz, L.A., et al., *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8407-11.
80. Ortiz, L.A., et al., *Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(26): p. 11002-7.
81. Curley, G.F., et al., *Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat*. Thorax, 2012. **67**(6): p. 496-501.
82. Minguell, J.J. and A. Erices, *Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(1): p. 39-49.
83. Iso, Y., et al., *Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(3): p. 700-6.
84. Cho, J., et al., *Myocardial injection with GSK-3beta-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction*. Circ Res, 2011. **108**(4): p. 478-89.
85. Kunter, U., et al., *Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2202-12.
86. Alfaro, C., et al., *Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats*. Cell Transplant, 2012. **21**(9): p. 2009-19.
87. Lee, R.H., et al., *Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17438-43.
88. Si, Y., et al., *Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity*. Diabetes, 2012. **61**(6): p. 1616-25.
89. Kanazawa, H., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19195.
90. Zhao, W., et al., *Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(10): p. 1048-58.
91. Phinney, D.G. and I. Isakova, *Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(10): p. 1255-65.
92. Phinney, D.G. and D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2896-902.
93. Prockop, D.J., *"Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs)*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(3): p. 241-3.
94. Horwitz, E.M., et al., *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8932-7.

95. Horwitz, E.M., et al., *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 309-13.
96. Horwitz, E.M., et al., *Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1227-31.
97. Otsuru, S., et al., *Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms*. Blood, 2012. **120**(9): p. 1933-41.
98. Stagg, J., *Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin*. Tissue Antigens, 2007. **69**(1): p. 1-9.
99. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
100. Klyushnenkova, E., et al., *T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression*. J Biomed Sci, 2005. **12**(1): p. 47-57.
101. Prevosto, C., et al., *Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction*. Haematologica, 2007. **92**(7): p. 881-8.
102. Tabera, S., et al., *The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes*. Haematologica, 2008. **93**(9): p. 1301-9.
103. Asari, S., et al., *Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation*. Exp Hematol, 2009. **37**(5): p. 604-15.
104. Sotiropoulou, P.A., et al., *Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells*. Stem Cells, 2006. **24**(1): p. 74-85.
105. Shi, M., Z.W. Liu, and F.S. Wang, *Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(1): p. 1-8.
106. Beyth, S., et al., *Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2214-9.
107. Ramasamy, R., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle*. Transplantation, 2007. **83**(1): p. 71-6.
108. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-41.
109. Ringden, O., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease*. Transplantation, 2006. **81**(10): p. 1390-7.
110. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. Lancet, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
111. Sun, L., et al., *Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2467-75.
112. Karussis, D. and I. Kassis, *The potential use of stem cells in multiple sclerosis: an overview of the preclinical experience*. Clin Neurol Neurosurg, 2008. **110**(9): p. 889-96.
113. Khalil, P.N., et al., *Nonmyeloablative stem cell therapy enhances microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2007. **132**(3): p. 944-54.
114. Blume KG, F.S., Appelbaum FR, *Thomas hematopoietic cell transplantation* 2004, Blackwell Publishing: Oxford.
115. Goldman, J.M., et al., *Marrow transplantation for patients in the chronic phase of chronic granulocytic leukaemia*. Lancet, 1982. **2**(8299): p. 623-5.
116. Storb, R. and E.D. Thomas, *Graft-versus-host disease in dog and man: the Seattle experience*. Immunol Rev, 1985. **88**: p. 215-38.
117. Deeg, H.J., *How I treat refractory acute GVHD*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4119-26.
118. Ringden, O. and B. Nilsson, *Death by graft-versus-host disease associated with HLA mismatch, high recipient age, low marrow cell dose, and splenectomy*. Transplantation, 1985. **40**(1): p. 39-44.
119. Remberger, M., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin*. Clin Transplant, 2001. **15**(3): p. 147-53.

120. Arima, N., et al., *Single intra-arterial injection of mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(2): p. 265-8.
121. Kebriaei, P., et al., *Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(7): p. 804-11.
122. Lazarus, H.M., et al., *Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005. **11**(5): p. 389-98.
123. Prasad, V.K., et al., *Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011. **17**(4): p. 534-41.
124. Lucchini, G., et al., *Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. **16**(9): p. 1293-301.
125. Ball, L.M., et al., *Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease*. *Br J Haematol*, 2013. **163**(4): p. 501-9.
126. Wernicke, C.M., et al., *Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases*. *Int Arch Med*, 2011. **4**(1): p. 27.
127. Muller, I., et al., *Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation*. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. **40**(1): p. 25-32.
128. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
129. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
130. Hall, B., M. Andreeff, and F. Marini, *The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles*. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(180): p. 263-83.
131. Knoop, K., et al., *Stromal targeting of sodium iodide symporter using mesenchymal stem cells allows enhanced imaging and therapy of hepatocellular carcinoma*. *Hum Gene Ther*, 2013. **24**(3): p. 306-16.
132. Knoop, K., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated, tumor stroma-targeted radioiodine therapy of metastatic colon cancer using the sodium iodide symporter as theranostic gene*. *J Nucl Med*, 2015. **56**(4): p. 600-6.
133. De Wever, O. and M. Mareel, *Role of tissue stroma in cancer cell invasion*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 429-47.
134. Hasebe, T., et al., *New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: clinicopathological significance of fibrotic focus*. *Pathol Int*, 2000. **50**(4): p. 263-72.
135. Kenny, P.A. and M.J. Bissell, *Tumor reversion: correction of malignant behavior by microenvironmental cues*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(5): p. 688-95.
136. Kurosumi, M., et al., *Prognostic significance of scoring system based on histological heterogeneity of invasive ductal carcinoma for node-negative breast cancer patients*. *Oncol Rep*, 2003. **10**(4): p. 833-7.
137. Kunz-Schughart, L.A. and R. Knuechel, *Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression?* *Histol Histopathol*, 2002. **17**(2): p. 599-621.
138. Kunz-Schughart, L.A. and R. Knuechel, *Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue*. *Histol Histopathol*, 2002. **17**(2): p. 623-37.
139. Mishra, P.J., et al., *Mesenchymal stem cells: flip side of the coin*. *Cancer Res*, 2009. **69**(4): p. 1255-8.
140. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 335-48.

141. Tlsty, T.D. and P.W. Hein, *Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(1): p. 54-9.
142. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 46-54.
143. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
144. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
145. Philip, M., D.A. Rowley, and H. Schreiber, *Inflammation as a tumor promoter in cancer induction*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 433-9.
146. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Curr Mol Med, 2003. **3**(7): p. 643-51.
147. Polverini, P.J. and S.J. Leibovich, *Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages*. Lab Invest, 1984. **51**(6): p. 635-42.
148. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
149. Silzle, T., et al., *The fibroblast: sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue*. Int J Cancer, 2004. **108**(2): p. 173-80.
150. Dong, J., et al., *VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis*. EMBO J, 2004. **23**(14): p. 2800-10.
151. Kammertoens, T., T. Schuler, and T. Blankenstein, *Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor*. Trends Mol Med, 2005. **11**(5): p. 225-31.
152. Kiaris, H., et al., *Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1627-30.
153. Nakamizo, A., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3307-18.
154. Emura, M., et al., *Development of myofibroblasts from human bone marrow mesenchymal stem cells cocultured with human colon carcinoma cells and TGF beta 1*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000. **36**(2): p. 77-80.
155. Ishii, G., et al., *Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(1): p. 232-40.
156. Direkze, N.C., et al., *Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice*. Stem Cells, 2003. **21**(5): p. 514-20.
157. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
158. Uchibori, R., et al., *NF-kappaB activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites*. Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 364-72.
159. Dwyer, R.M., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(17): p. 5020-7.
160. Menon, L.G., et al., *Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells*. Stem Cells, 2007. **25**(2): p. 520-8.
161. Teo, G.S., et al., *Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms*. Stem Cells, 2012. **30**(11): p. 2472-86.
162. Nakamura, K., et al., *Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model*. Gene Ther, 2004. **11**(14): p. 1155-64.
163. Hung, S.C., et al., *Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(21): p. 7749-56.
164. Komarova, S., et al., *Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(3): p. 755-66.
165. Khakoo, A.Y., et al., *Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1235-47.

166. Knoop, K., et al., *Image-guided, tumor stroma-targeted ¹³¹I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery*. Mol Ther, 2011. **19**(9): p. 1704-13.
167. Zischek, C., et al., *Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma*. Ann Surg, 2009. **250**(5): p. 747-53.
168. Loebinger, M.R., et al., *Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4134-42.
169. Loebinger, M.R., et al., *Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles*. Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 8862-7.
170. Stoff-Khalili, M.A., et al., *Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAbs to lung metastases of breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **105**(2): p. 157-67.
171. Xin, H., et al., *Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1618-26.
172. Mohr, A., et al., *Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6B): p. 2628-43.
173. Huss, R., et al., *[Chemokine directed homing of transplanted adult stem cells in wound healing and tissue regeneration]*. Verh Dtsch Ges Pathol, 2004. **88**: p. 170-3.
174. Niess, H., et al., *Selective targeting of genetically engineered mesenchymal stem cells to tumor stroma microenvironments using tissue-specific suicide gene expression suppresses growth of hepatocellular carcinoma*. Ann Surg, 2011. **254**(5): p. 767-74; discussion 774-5.
175. Chen, X.C., et al., *Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs*. Carcinogenesis, 2006. **27**(12): p. 2434-41.
176. Stagg, J., et al., *Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(6): p. 597-608.
177. Keung, E.Z., P.J. Nelson, and C. Conrad, *Concise review: genetically engineered stem cell therapy targeting angiogenesis and tumor stroma in gastrointestinal malignancy*. Stem Cells, 2013. **31**(2): p. 227-35.
178. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *"Tie-ing" down the hematopoietic niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 139-40.
179. De Palma, M., et al., *Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 211-26.
180. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
181. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
182. Conrad, C., et al., *Linking transgene expression of engineered mesenchymal stem cells and angiopoietin-1-induced differentiation to target cancer angiogenesis*. Ann Surg, 2011. **253**(3): p. 566-71.
183. Niess, H., et al., *Treatment of advanced gastrointestinal tumors with genetically modified autologous mesenchymal stromal cells (TREAT-ME1): study protocol of a phase I/II clinical trial*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 237.
184. Dai, G., O. Levy, and N. Carrasco, *Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter*. Nature, 1996. **379**(6564): p. 458-60.
185. Jhiang, S.M., et al., *An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4416-9.
186. Smanik, P.A., et al., *Cloning of the human sodium iodide symporter*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(2): p. 339-45.
187. Spitzweg, C., et al., *Expression of the sodium iodide symporter in human kidney*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 1013-23.
188. Spitzweg, C., et al., *Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary*

- gland, mammary gland, and gastric mucosa.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(5): p. 1746-51.
189. Spitzweg, C., et al., *Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(11): p. 4178-84.
 190. Tazebay, U.H., et al., *The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer.* Nat Med, 2000. **6**(8): p. 871-8.
 191. Spitzweg, C., *Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS): Bedeutung für die Bildgebung und therapeutische Optionen.* Nuklearmedizin, 2007. **30**(1): p. 19-30.
 192. Spitzweg, C. and J.C. Morris, *The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications.* Clin Endocrinol (Oxf), 2002. **57**(5): p. 559-74.
 193. Pinke, L.A., et al., *Cloning of the mouse sodium iodide symporter.* Thyroid, 2001. **11**(10): p. 935-9.
 194. Hingorani, M., et al., *The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery.* Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(2): p. 242-67.
 195. Spitzweg, C., *[The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance].* Internist (Berl), 2003. **44**(4): p. 396-402, 404-8, 410-1.
 196. Carrasco, N., *Iodide transport in the thyroid gland.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1154**(1): p. 65-82.
 197. Spitzweg, C., et al., *Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(7): p. 3327-35.
 198. Van Sande, J., et al., *Anion selectivity by the sodium iodide symporter.* Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 247-52.
 199. Dohan, O., et al., *The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance.* Endocr Rev, 2003. **24**(1): p. 48-77.
 200. Kogai, T., et al., *Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells.* Endocrinology, 1997. **138**(6): p. 2227-32.
 201. Saito, T., et al., *Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(10): p. 3331-6.
 202. Spitzweg, C., A.E. Heufelder, and J.C. Morris, *Thyroid iodine transport.* Thyroid, 2000. **10**(4): p. 321-30.
 203. Spitzweg, C., et al., *Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells.* Thyroid, 1999. **9**(8): p. 821-30.
 204. Wolff, J. and I.L. Chaikoff, *Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function.* J Biol Chem, 1948. **174**(2): p. 555-64.
 205. Wolff, J., I.L. Chaikoff, and et al., *The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid.* Endocrinology, 1949. **45**(5): p. 504-13, illust.
 206. Royaux, I.E., et al., *Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells.* Endocrinology, 2000. **141**(2): p. 839-45.
 207. Castro, M.R., et al., *Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(8): p. 2957-62.
 208. Caillou, B., et al., *Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(11): p. 4102-6.
 209. Joba, W., et al., *Analysis of human sodium/iodide symporter, thyroid transcription factor-1, and paired-box-protein-8 gene expression in benign thyroid diseases.* Thyroid, 1999. **9**(5): p. 455-66.
 210. Russo, D., et al., *Sodium/iodide symporter (NIS) and pendrin are expressed differently in hot and cold nodules of thyroid toxic multinodular goiter.* Eur J Endocrinol, 2001. **145**(5): p. 591-7.
 211. Krohn, K., et al., *Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter.* Endocr Rev, 2005. **26**(4): p. 504-24.

212. Tonacchera, M., et al., *Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium iodide symporter protein*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(1): p. 352-7.
213. Mazzaferri, E.L. and J. Robyn, *Postsurgical management of differentiated thyroid carcinoma*. Otolaryngol Clin North Am, 1996. **29**(4): p. 637-62.
214. Mazzaferri, E.L. and R.T. Kloos, *Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(4): p. 1447-63.
215. Castro, M.R., et al., *Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer*. J Endocrinol, 1999. **163**(3): p. 495-504.
216. Castro, M.R., et al., *Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(11): p. 5627-32.
217. Saito, T., et al., *Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1296-300.
218. Dohan, O., et al., *Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2697-700.
219. Knostman, K.A., et al., *Signaling through 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and phosphoinositide-3 kinase induces sodium/iodide symporter expression in breast cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(10): p. 5196-203.
220. Rudnicka, L., et al., *Expression of the Na(+)/I(-) symporter in invasive ductal breast cancer*. Folia Histochem Cytobiol, 2003. **41**(1): p. 37-40.
221. Weeks, A.J., et al., *Evaluation of [18F]-tetrafluoroborate as a potential PET imaging agent for the human sodium/iodide symporter in a new colon carcinoma cell line, HCT116, expressing hNIS*. Nucl Med Commun, 2011. **32**(2): p. 98-105.
222. Cascini, G.L., et al., *124 Iodine: a longer-life positron emitter isotope-new opportunities in molecular imaging*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 672094.
223. Dingli, D., et al., *Combined I-124 positron emission tomography/computed tomography imaging of NIS gene expression in animal models of stably transfected and intravenously transfected tumor*. Mol Imaging Biol, 2006. **8**(1): p. 16-23.
224. Groot-Wassink, T., et al., *Quantitative imaging of Na/I symporter transgene expression using positron emission tomography in the living animal*. Mol Ther, 2004. **9**(3): p. 436-42.
225. Penheiter, A.R., S.J. Russell, and S.K. Carlson, *The sodium iodide symporter (NIS) as an imaging reporter for gene, viral, and cell-based therapies*. Curr Gene Ther, 2012. **12**(1): p. 33-47.
226. Miyagawa, M., et al., *Cardiac reporter gene imaging using the human sodium/iodide symporter gene*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 195-202.
227. Merron, A., et al., *SPECT/CT imaging of oncolytic adenovirus propagation in tumours in vivo using the Na/I symporter as a reporter gene*. Gene Ther, 2007. **14**(24): p. 1731-8.
228. Shimura, H., et al., *Iodide uptake and experimental 131I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na+/I- symporter gene*. Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4493-6.
229. Mandell, R.B., L.Z. Mandell, and C.J. Link, Jr., *Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene*. Cancer Res, 1999. **59**(3): p. 661-8.
230. Boland, A., et al., *Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3484-92.
231. Spitzweg, C., et al., *Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines*. Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2136-41.
232. Spitzweg, C., et al., *Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter*. Cancer Res, 2000. **60**(22): p. 6526-30.

233. Spitzweg, C., et al., *Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells*. *Endocrinology*, 2003. **144**(8): p. 3423-32.
234. Scholz, I.V., et al., *Dexamethasone enhances the cytotoxic effect of radioiodine therapy in prostate cancer cells expressing the sodium iodide symporter*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(3): p. 1108-16.
235. Spitzweg, C., et al., *In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer*. *Gene Ther*, 2001. **8**(20): p. 1524-31.
236. Kakinuma, H., et al., *Probasin promoter (ARR(2)PB)-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter (h-NIS) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7840-4.
237. Dwyer, R.M., et al., *A preclinical large animal model of adenovirus-mediated expression of the sodium-iodide symporter for radioiodide imaging and therapy of locally recurrent prostate cancer*. *Mol Ther*, 2005. **12**(5): p. 835-41.
238. Willhauck, M.J., et al., *Alpha-fetoprotein promoter-targeted sodium iodide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma*. *Gene Ther*, 2008. **15**(3): p. 214-23.
239. Chen, L., et al., *Radioiodine therapy of hepatoma using targeted transfer of the human sodium/iodide symporter gene*. *J Nucl Med*, 2006. **47**(5): p. 854-62.
240. Klutz, K., et al., *Image-guided tumor-selective radioiodine therapy of liver cancer after systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene*. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(12): p. 1563-74.
241. Klutz, K., et al., *Epidermal growth factor receptor-targeted (131)I-therapy of liver cancer following systemic delivery of the sodium iodide symporter gene*. *Mol Ther*, 2011. **19**(4): p. 676-85.
242. Grunwald, G.K., et al., *Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy of hepatocellular cancer using a conditionally replicating adenovirus*. *Gene Ther*, 2013. **20**(6): p. 625-33.
243. Cengic, N., et al., *A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(8): p. 4457-64.
244. Scholz, I.V., et al., *Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer*. *Gene Ther*, 2005. **12**(3): p. 272-80.
245. Dwyer, R.M., et al., *In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(4): p. 1483-9.
246. Schipper, M.L., et al., *Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(6): p. 1333-8.
247. Dingli, D., et al., *Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma*. *Blood*, 2003. **102**(2): p. 489-96.
248. Dwyer, R.M., et al., *Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice*. *Gene Ther*, 2006. **13**(1): p. 60-6.
249. Dwyer, R.M., et al., *Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits in vivo radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors*. *Hum Gene Ther*, 2006. **17**(6): p. 661-8.
250. Spitzweg, C., et al., *Image-guided radioiodide therapy of medullary thyroid cancer after carcinoembryonic antigen promoter-targeted sodium iodide symporter gene expression*. *Hum Gene Ther*, 2007. **18**(10): p. 916-24.
251. Klutz, K., et al., *Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radionuclide ((131)I, (188)Re) therapy of liver cancer after transcriptionally targeted intratumoral in vivo NIS gene delivery*. *Hum Gene Ther*, 2011. **22**(11): p. 1403-12.
252. Patel, M.R. and R.A. Kratzke, *Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials*. *Transl Res*, 2013. **161**(4): p. 355-64.

253. Goel, A., et al., *Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(Delta51)-NIS, an attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene*. *Blood*, 2007. **110**(7): p. 2342-50.
254. Blechacz, B., et al., *Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2006. **44**(6): p. 1465-77.
255. Klutz, K., et al., *Targeted radioiodine therapy of neuroblastoma tumors following systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(19): p. 6079-86.
256. Everts, B. and H.G. van der Poel, *Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2005. **12**(2): p. 141-61.
257. Kang, E. and C.O. Yun, *Current advances in adenovirus nanocomplexes: more specificity and less immunogenicity*. *BMB Rep*, 2010. **43**(12): p. 781-8.
258. Grunwald, G.K., et al., *Systemic image-guided liver cancer radiovirotherapy using dendrimer-coated adenovirus encoding the sodium iodide symporter as theranostic gene*. *J Nucl Med*, 2013. **54**(8): p. 1450-7.
259. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. *Adv Enzyme Regul*, 2001. **41**: p. 189-207.
260. Hart, L.S., et al., *The adenovirus E4orf6 protein inhibits DNA double strand break repair and radiosensitizes human tumor cells in an E1B-55K-independent manner*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1474-81.
261. Advani, S.J., et al., *ReVOLT: radiation-enhanced viral oncolytic therapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(3): p. 637-46.
262. Hingorani, M., et al., *Radiation-mediated up-regulation of gene expression from replication-defective adenoviral vectors: implications for sodium iodide symporter gene therapy*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(15): p. 4915-24.
263. Grunwald, G.K., et al., *EGFR-Targeted Adenovirus Dendrimer Coating for Improved Systemic Delivery of the Theranostic NIS Gene*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013. **2**: p. e131.
264. Urnauer, S., et al., *Sequence-defined cMET/HGFR-targeted Polymers as Gene Delivery Vehicles for the Theranostic Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene*. *Mol Ther*, 2016. **24**(8): p. 1395-404.
265. Willhauck, M.J., et al., *Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **109**(2): p. 263-72.
266. Kassem, M., *Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications*. *Cloning Stem Cells*, 2004. **6**(4): p. 369-74.
267. Thalmeier, K. and R. Huss, *Highly efficient retroviral gene transfer into immortalized CD34(-) cells and organ distribution after transplantation into NOD/SCID mice*. *Cytotherapy*, 2001. **3**(4): p. 245-51.
268. Weiss, S.J., N.J. Philp, and E.F. Grollman, *Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid*. *Endocrinology*, 1984. **114**(4): p. 1090-8.
269. Deng, Q., et al., *TRAIL-secreting mesenchymal stem cells promote apoptosis in heat-shock-treated liver cancer cells and inhibit tumor growth in nude mice*. *Gene Ther*, 2014. **21**(3): p. 317-27.
270. Gao, P., et al., *Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma*. *Cancer Lett*, 2010. **290**(2): p. 157-66.
271. Kim, S.M., et al., *Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(23): p. 9614-23.
272. Carlin, S., et al., *Experimental targeted radioiodide therapy following transfection of the sodium iodide symporter gene: effect on clonogenicity in both two-and three-dimensional models*. *Cancer Gene Ther*, 2000. **7**(12): p. 1529-36.
273. Renier, C., et al., *Regression of experimental NIS-expressing breast cancer brain metastases in response to radioiodide/gemcitabine dual therapy*. *Oncotarget*, 2016.

274. Hart, I.R., *Tissue specific promoters in targeting systemically delivered gene therapy*. Semin Oncol, 1996. **23**(1): p. 154-8.
275. Brahimi-Horn, M.C., J. Chiche, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and cancer*. J Mol Med (Berl), 2007. **85**(12): p. 1301-7.
276. Ruan, K., G. Song, and G. Ouyang, *Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer*. J Cell Biochem, 2009. **107**(6): p. 1053-62.
277. Hockel, M. and P. Vaupel, *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(4): p. 266-76.
278. Kim, Y., et al., *Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation*. Curr Mol Med, 2009. **9**(4): p. 425-34.
279. Greer, S.N., et al., *The updated biology of hypoxia-inducible factor*. EMBO J, 2012. **31**(11): p. 2448-60.
280. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
281. Muller, A.M., et al., *Hypoxia-targeted 131I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated sodium iodide symporter gene delivery*. Oncotarget, 2016.
282. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. Nature, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
283. Spaeth, E.L., et al., *Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e4992.
284. Zhu, W., et al., *Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo*. Exp Mol Pathol, 2006. **80**(3): p. 267-74.
285. Djouad, F., et al., *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3837-44.
286. Rhee, K.J., J.I. Lee, and Y.W. Eom, *Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(12): p. 30015-33.
287. Ohlsson, L.B., et al., *Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix*. Exp Mol Pathol, 2003. **75**(3): p. 248-55.
288. Qiao, L., et al., *Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model*. Cell Res, 2008. **18**(4): p. 500-7.
289. Qiao, L., et al., *Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling*. Cancer Lett, 2008. **269**(1): p. 67-77.
290. Cho, J.Y., et al., *In vivo imaging and radioiodine therapy following sodium iodide symporter gene transfer in animal model of intracerebral gliomas*. Gene Ther, 2002. **9**(17): p. 1139-45.
291. Haberkorn, U., et al., *Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells*. J Nucl Med, 2001. **42**(2): p. 317-25.
292. Haberkorn, U., et al., *Enhanced iodide transport after transfer of the human sodium iodide symporter gene is associated with lack of retention and low absorbed dose*. Gene Ther, 2003. **10**(9): p. 774-80.
293. Sieger, S., et al., *Tumour-specific activation of the sodium/iodide symporter gene under control of the glucose transporter gene 1 promoter (GTI-1.3)*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003. **30**(5): p. 748-56.
294. Hoher, M., et al., *Intracoronary beta-irradiation with a liquid (188)re-filled balloon: six-month results from a clinical safety and feasibility study*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2355-60.
295. Knapp, F.F., Jr., *Rhenium-188--a generator-derived radioisotope for cancer therapy*. Cancer Biother Radiopharm, 1998. **13**(5): p. 337-49.
296. Seitz, U., et al., *Preparation and evaluation of the rhenium-188-labelled anti-NCA antigen monoclonal antibody BW 250/183 for radioimmunotherapy of leukaemia*. Eur J Nucl Med, 1999. **26**(10): p. 1265-73.
297. Lambert, B. and J.M. de Klerk, *Clinical applications of 188Re-labelled radiopharmaceuticals for radionuclide therapy*. Nucl Med Commun, 2006. **27**(3): p. 223-9.

298. O'Donoghue, J.A., M. Bardies, and T.E. Wheldon, *Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides*. J Nucl Med, 1995. **36**(10): p. 1902-9.
299. Dadachova, E., et al., *Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth*. Nucl Med Biol, 2005. **32**(7): p. 695-700.
300. Dadachova, E., et al., *Rhenium-188 as an alternative to Iodine-131 for treatment of breast tumors expressing the sodium/iodide symporter (NIS)*. Nucl Med Biol, 2002. **29**(1): p. 13-8.
301. Willhauck, M.J., et al., *Application of 188rhenium as an alternative radionuclide for treatment of prostate cancer after tumor-specific sodium iodide symporter gene expression*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(11): p. 4451-8.
302. Kang, J.H., et al., *Establishment of a human hepatocellular carcinoma cell line highly expressing sodium iodide symporter for radionuclide gene therapy*. J Nucl Med, 2004. **45**(9): p. 1571-6.
303. Guo, R., et al., *Theranostic studies of human sodium iodide symporter imaging and therapy using 188Re: a human glioma study in mice*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e102011.
304. Shen, D.H., et al., *Effects of dose, intervention time, and radionuclide on sodium iodide symporter (NIS)-targeted radionuclide therapy*. Gene Ther, 2004. **11**(2): p. 161-9.
305. Carlin, S., G. Akabani, and M.R. Zalutsky, *In vitro cytotoxicity of (211)at-astatide and (131)I-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter*. J Nucl Med, 2003. **44**(11): p. 1827-38.
306. Petrich, T., et al., *Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. **29**(7): p. 842-54.
307. Petrich, T., et al., *Effective cancer therapy with the alpha-particle emitter [211At]astatine in a mouse model of genetically modified sodium/iodide symporter-expressing tumors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1342-8.
308. Carlin, S., et al., *Sodium-iodide symporter (NIS)-mediated accumulation of [(211)At]astatide in NIS-transfected human cancer cells*. Nucl Med Biol, 2002. **29**(7): p. 729-39.
309. Willhauck, M.J., et al., *The potential of 211Astatine for NIS-mediated radionuclide therapy in prostate cancer*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(7): p. 1272-81.
310. Hall, E., *Radiobiology for the Radiologist*, Lippincott, Editor. 1988: Philadelphia. p. 161-177.

7. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosin-5`-Diphosphat
AFP	alpha Fetoprotein
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AKT	Signalweg (Gen der Proteinkinasen B)
At ⁻	Astat
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
Bq	Bequerel
Br ⁻	Bromium
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Karzinom
CAF	carcinoma associated Fibroblasts
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Diffentiation
cDNA	complementary DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Ci	Curie
ClO ₃ ⁻	Chlorat Ion
cMET	Teil der Proteinkinase cMET/HGFR
CMV	Cytomegalievirus

cpm	counts per minute
CCL5	Chemokine = RANTES
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	Colony stimulating factor
CT	Computertomographie
CX3CL1	Chemokin
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
dT Primer	deoxythymine Primer
DTT	Dithiothreitol
E	Energie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPR	enhanced permeability and retention effect
Fg	Femtogramm
FRTL	Fisher rat thyrocyte cell line
F-TFB	Fluor-tetrafluoroborat
g	Gramm
g	Beschleunigungskonstante
G2-HD-OEI	pseudodendritische Oligoamine
GM-CSF	Granulozyten-macrophagenstimulierenden Faktor
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
gy	Gray
GvHD	Graft versus Host Disease
h	Stunde

HBSS	Hanks balanced salt solution
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	humane Leberkarzinomzellen
HGF	hepatocyte growth factor
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HIF	Hypoxia-inducible factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLA DR	Human Leukocyte Antigen Isotyp
HMLER	Mammakarzinom Zellen
hNIS	humanes NIS
HSV-TK	Herpes Simplex virus Thymidine Kinase
I	Iod
ID/g	Injected Dose pro Gramm
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
K	Kalium
KClO ₄	Kaliumperchlorat
kDa	Kilodalton
keV	Kilo Elektronen Volt
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Lysogeny broth
LET	linearer Energietransfer
NO ₃ ⁻	Nitrat
LNCaP	Prostatakarzinomzellen
LPEI	linear polyethylenimine
M	Mol/Liter

MBq	Megabequerel
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Makrophagenstimulierenden Faktor
MCSF-7	humane Mammakarzinom Zellen
MCF/Ras	Mammakarzinom Zellen
MDA-MB-23	Mammakarzinom Zellen
MDA-MB435	Mammakarzinom Zellen
MeV	Mega-elektronen-Volt
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGy	milliGray
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen/Stromazellen
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MUC	transmembranes Glycoprotein
mV	millivolt
mm	Millimeter
μCi	MikroCurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
N	molare Masse
Na	Natrium
NABMC	Non-(plastic)-adherent bone marrow cells
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat

NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NIS	Na-Iodid-Symporter
NK Zellen	natürliche Killer Zellen
nm	Nanometer
NPT	Na-Proline Symporter
nu	nude
OD	optische Dichte
OI	Osteogenesis Imperfecta
P	Phosphat
PBS	phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandin 2
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PutP	Na-Proline Symporter
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
PAMAM-G5	poly(amidoamine) Dendrimeren der 5. Generation
PB	Probasin
PDGF	plateled derived growth factor
PEI	Polyethelenimine
PMS	phenazine methosulfate
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTD	Protein Transduction Domains
RANTES	Regulated on Activation, normal T-cell Expressed and presumably secreted
RAS	Protoonkogen
ReO ₄ ⁻	Rhenium
Re	Rhenium
RFP	red fluorescent protein

RIBBE	radiation induced biological bystander effect
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
Sca-1	Stem cells antigen-1
SCF	stem cell factor
SCN ⁻	Thiocyanat
SeCN ⁻	Selenocyanat
SDF-1 α	Stromal cell derived factor 1 α
SDS	sodium dodecyl sulfate
SGLT	Na-Glukose Cotransporter
SLC5A5	Gen welches für NIS kodiert
SMCT	Na-Monocarboxylat Transporter
SMIT	Na-Myositol Cosymporter
SMVT	Na-Multivitamintransporter
SOC Medium	Super Optimal Broth Medium
SPECT	Single-Photon-Emissions-Tomographie
STRO-1	mesenchymaler Stammzellmarker
TAF	Tumorassoziierte Fibroblasten
TBST	Tris buffered saline and tween
Tc	Technecium
TcO ₄ ⁻	Pertechnetat
Tg	Thyreoglobulin
Tie2	Tyrosine Kinase with immunoglobuline-like and EGF-like Domains 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TGF- β	Transforming growth factor beta
TSH	Thyreoida stimulierendes Hormon

TPO	Schilddrüsenperoxidase
TRAIL	Tumornecrosis factor related apoptosis inducing ligant
T3	Triiodthyronin
T4	Tyroxin
U	Umdrehungen/Minute
u.a.	unter anderem
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
UV	ultraviolett
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wnt	Signalweg (W g für Wingless und Int -1)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abb. 1: Der Natrium-Iodid Symporter (<i>Spitzweg C et al., 2001</i>)	Seite 15
Abb. 2: Schematische Darstellung der Iod Aufnahme, des Iod Transportes und der Organifizierung in Schilddrüsenzellen (<i>Spitzweg C et al., 2001</i>)	Seite 17
Abb. 3: Die Rolle des NIS-Gens als theranostisches Gen (<i>Spitzweg C, 2007</i>)	Seite 28
Abb. 4: Iodaufnahme in p53NIS und p53WT Zellen	Seite 51
Abb. 5: Iodaufnahme in L87NIS und L87WT Zellen	Seite 51
Abb. 6: Zeitabhängige Iodakkumulation in p53NIS Zellen	Seite 52
Abb. 7: Zeitabhängige Iodakkumulation in L87NIS Zellen	Seite 53
Abb. 8: Iod Efflux in p53NIS Zellen	Seite 54
Abb. 9: Iod Efflux in L87NIS Zellen	Seite 54
Abb. 10: Nachweis der NIS mRNA mittels qPCR	Seite 55
Abb. 11: Western Blot Analyse der p53NIS Zellen	Seite 56
Abb. 12: Western Blot Analyse der L87NIS Zellen	Seite 57
Abb. 13: Zytotox. Effekt von ^{131}I od in p53NIS und p53WT Zellen	Seite 58
Abb. 14: Zytotox. Effekt von ^{131}I od in L87NIS und L87WT Zellen	Seite 58
Abb. 15: Zytotox. Effekt von ^{131}I od in Mischkulturen (HCC/p53NIS Zellen)	Seite 60
Abb. 16: Zytotox. Effekt von ^{131}I od in Mischkulturen (HCC/L87NIS Zellen)	Seite 61

9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. B. Göke möchte ich für die ausgezeichneten Rahmen- und Arbeitsbedingungen während des experimentellen Teils meiner Promotion im Labor von Fr. Prof. Dr. med. Spitzweg in der II. Medizinischen Klinik am Klinikum Großhadern danken.

Besonders jedoch, möchte ich mich bei meiner Doktormutter und Betreuerin Fr. Prof. Dr. med. Christine Spitzweg für die Überlassung dieses interessanten und vielfältigen Themas und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Sie ermöglichte mir den ersten Einblick ins wissenschaftliche Arbeiten und hat mich fortwährend mit unermüdlichem Engagement, fundiertem Wissen, kompetenten Ratschlägen und ausgezeichneter Betreuung unterstützt. Vielen Dank!

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter Nelson für die zur Verfügung gestellten mesenchymalen Stammzellen danken.

Besonderer Dank gilt natürlich auch allen Kollegen in der Arbeitsgruppe von Fr. Prof. Dr. med. Spitzweg, insbesondere Dr. med. Michael Willhauck, Dr. rer. nat. Kathrin Klutz und Dr. rer. nat. Kerstin Knoop für die kompetente fachliche Unterstützung. Mit ihren Ratschlägen und Verbesserungsvorschlägen waren sie stets wertvolle Ansprechpartner.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei Nathalie Schwenk bedanken, für ihre Einarbeitung in die Methodik und für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, sowohl fachlicher wie auch persönlicher Natur.

Zum Schluß möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, die es mir ermöglicht haben diesen beruflichen Weg zu beschreiten und mir jederzeit zur Seite standen. Auch allen Freunden, insbesondere Christina Schrödl, die mich während dieser Zeit begleiten haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten, möchte ich hiermit danken.

Ganz besonderer Dank gilt auch Ioannis Vlachiotis für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei der Ausarbeitung des Layouts dieser Dissertation und meinem Bruder Dimitry für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

10. VERÖFFENTLICHUNGEN

Auszüge dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Publikation:

Image-guided, tumor stroma-targeted ^{131}I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery

Knoop K, Kolokythas M, Klutz K, Willhauck MJ, Wunderlich N, Draganovici D, Zach C, Gildehaus FJ, Böning G, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

Mol Ther. 2011 Sep;19(9):1704-13

Vorträge:

93rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Boston, USA, Juni 2011

Therapeutic potential of stem cell-mediated sodium iodide symporter (NIS) gene delivery in liver cancer

Kerstin Knoop, Marie Kolokythas, Christoph Zischek, Kathrin Klutz, Michael J Willhauck, Nathalie Wunderlich, Dan Draganovici, Christian Zach, Franz Josef Gildehaus, Burkhard Göke, Ernst Wagner, Peter J Nelson, Christine Spitzweg

17th Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy, München, Oktober 2010

Tumor stroma-specific NIS gene delivery using mesenchymal stem cells

Kerstin Knoop, Marie Kolokythas, Kathrin Klutz, Michael J Willhauck, Nathalie Wunderlich, Dan Draganovici, Christian Zach, Franz Josef Gildehaus, Burkhard Göke, Ernst Wagner, Peter J. Nelson, Christine Spitzweg

92nd Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, USA, Juni 2010

In vivo imaging of mesenchymal stem cell recruitment into the tumor stroma of hepatocellular carcinoma (HCC) using the sodium iodide symporter as reporter gene

Kerstin Knoop, Marie Kolokythas, Christoph Zischek, Kathrin Klutz, Michael J Willhauck, Nathalie Wunderlich, Dan Draganovici, Christian Zach, Franz Josef Gildehaus, Burkhard Göke, Ernst Wagner, Peter J. Nelson, Christine Spitzweg

DoktaMed Doktorarbeitstage Medizin, München, Mai 2010

Molekulare Bildgebung und gezielte Radionuklidtherapie extrathyreoidaler Tumore nach Stammzell-basiertem Natrium/Iodid-Symporter (NIS) Gentransfer

M. Kolokythas, K. Knoop, C. Zischek, K. Klutz, M.J. Willhauck, N. Wunderlich, D.

Draganovici, C. Zach, F. Gildehaus, B. Göke, C. Spitzweg

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Kolokythas, Marie-Christine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Molekulare Bildgebung und gezielte Radionuklidtherapie extrathyreoidaler
Tumore nach Stammzell-basiertem Natrium/Iodid-Symporter
(NIS) - Gentransfer**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 05.02.2019

Ort, Datum

Marie-Christine Kolokythas

Unterschrift Doktorandin/Doktorand